

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal



TESIS DOCTORAL

**Estudios sobre la autólisis de Botrytis Cinerea : efectos de su
patogenicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Jesús Martínez Hernández

Madrid, 2015

María Jesús Martínez Hernández

TP
1981
119



* 5 3 0 9 8 5 5 9 4 9 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-013706-1

ESTUDIOS SOBRE LA AUTOLISIS DE BOTRYTIS CINEREA. EFECTOS
DE SU PATOGENICIDAD

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© María Jesús Martínez Hernández
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-15918-1981

ESTUDIOS SOBRE LA AUTOLISIS DE BOTRYTIS

CINEREA. EFECTOS DE SU PATOGENICIDAD.

Trabajo presentado por María
Jesús Martínez Hernández, pa-
ra la obtención del Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
de la Universidad Complutense
de Madrid.

Madrid, Marzo de 1980.

Quiero expresar mi gratitud al Centro de Investigaciones Biológicas, y especialmente al Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C.S.I.C., donde he realizado el presente trabajo.

Asi mismo quiero agradecer al Dr. D. Alfredo Carrato, catedfatico de Histología vegetal y animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, por aceptar la ponencia de esta Tesis, y a la Dra.Dña. Fuensanta Reyes por la dirección de la misma. También agradezco al Dr.D.Rafael Lahoz por sus orientaciones, y a todos mis compañeros de trabajo, en especial a la Srta. María Teresa Raposo, por las ayudas que me han prestado en múltiples ocasiones, las cuales han hecho posible la realización de este trabajo.

INDICE

| | <u>Página</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| I.- INTRODUCCION | 1 |
| II.- MATERIALES, METODOS Y PARTE EXPERIMENTAL | 17 |
| - Microorganismo empleado | 18 |
| - Preparación del inóculo y medio de cultivo. | 18 |
| - Método para la determinación de azúcares reductores libres en el líquido de cultivo. | 20 |
| - Método para la determinación de proteínas en el líquido de cultivo | 25 |
| - Preparación de soluciones tampón | 28 |
| - Valoración de enzimas líticas en el líquido de cultivo | 32 |
| - Método para separar endopolimetilgalacturo- nasa y endopectinliasa | 58 |
| - Valoración de enzimas proteolíticos | 59 |
| - Método de determinación de glucosa. Gluco- sa oxidasa | 60 |
| - Determinación de carbohidratos | 61 |
| - Obtención del extracto de micelio | 65 |
| - Obtención de enzimas líticas | 66 |
| - Valoración de las diferentes actividades | |

| | <u>Página</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| enzimáticas | 66 |
| - Obtención de paredes celulares | 67 |
| - Determinación de las actividades enzi- máticas de las paredes | 69 |
| - Calculo del grado de autólisis | 69 |
| - Degradación de paredes celulares | 70 |
| - Determinación de las características ci- néticas de los enzimas | 72 |
| - Filtración en gel con Sephadex | 74 |
| - Cromatografías | 76 |
| - Experimentos en plantas de judía | 77 |
| - Maceración de tejidos | 79 |
| - Localización de la B-N-acetilglucosami- nidasas al microscopio óptico | 82 |
| - Localización de este enzima al microscopio electrónico | 84 |
| - Técnicas de microscopía electrónica | 88 |
| III.- RESULTADOS | 91 |
| - Curso del proceso autolítico | 94 |
| - Estudios cinéticos | 101 |
| - Enzimas proteolíticos | 162 |
| - Actividades enzimáticas durante la auto- lisis | 163 |

| | <u>Página</u> |
|-------------------------------------------------|---------------|
| - Columna en gel de Sephadex | 198 |
| - Cromatografía | 200 |
| - Paredes celulares | 201 |
| - Experimentos en plantas de judía | 209 |
| - Maceración de tejidos | 217 |
| - Localización de la B-N-acetilglucosaminidasa. | 222 |
| IV .- DISCUSION | 230 |
| V .- CONCLUSIONES | 248 |
| VI .- BIBLIOGRAFIA | 252 |

INTRODUCCION

1.

Los hongos son organismos omnipresentes, que juegan un papel esencial en la economía de la naturaleza, y afectan profundamente el desarrollo de la humanidad.

Constituyen un enorme grupo, muy complejo, de formas de vivir diferentes. Su tamaño varía, desde los grandes hongos que encontramos en los bosques, a las formas unicelulares. Hay especies comestibles, y otras venenosas. Unos son parásitos muy dañinos de plantas, animales y diferentes materias, mientras otros habitan en el suelo degradando la materia orgánica muerta y produciendo sustancias asimilables por las plantas, contribuyendo así al ciclo vital de la naturaleza. También hay hongos de gran interés industrial, que cultivados convenientemente producen vitaminas, antibióticos, enzimas, etc.

Los hongos son organismos heterótrofos que viven como saprófitos, parásitos o asociados con otros organismos como simbióticos.

Los hongos filamentosos o mohos, se caracterizan por su estructura vegetativa, filamentosa y multinucleada, conocida como micelio. Este micelio está formado por hifas o tubos de gruesas paredes, que contienen el protoplasma celular, y que continuamente se extienden por crecimiento apical o por ramificaciones laterales. El alimento es absorbido por toda la superficie del micelio. Después de un periodo de crecimiento, tiene lugar la reproducción, con

2.

formación de esporas uninucleadas o multinucleadas, que -
dan lugar a nuevos individuos.

Cuando se suministra a los hongos filamentosos la materia orgánica necesaria (generalmente la fuente carbonada, ya que son capaces, en general, de asimilar el nitrógeno inorgánico y ciertas sales minerales), la mayoría de ellos crecen fácilmente en medios relativamente simples siendo por tanto excelentes individuos para el estudio - del quimismo de la célula en el laboratorio.

La cinética del crecimiento de microorganismos - presenta varias fases bien definidas. Mandel (1965), las recoge en una curva ideal para microorganismos unicelulares en el libro "The Fungi", y que aplica con limitaciones al crecimiento de los hongos filamentosos (crecimiento tridimensional de las hifas), considerando las siguientes fases:

- 1.- Fase de latencia o adaptación al medio.
- 2.- Fase de aceleración o iniciación de la división celular.
- 3.- Fase exponencial o logarítmica, con una velocidad uniforme de crecimiento.
- 4.- Fase de desaceleración o decrecimiento de la división celular.
- 5.- Fase estacionaria, en la que cesa la división celular.
- 6.- Fase de decadencia, o autólisis, con un decrecimiento de las células viables.

3.

La fase de decadencia, o autólisis, sobreviene como una consecuencia de la falta de nutrientes en el medio, principalmente de la fuente carbonada. Esta fase, como hemos comprobado en la búsqueda exhaustiva a través de la bibliografía, es la que menor atención ha recibido por parte de los investigadores dedicados al estudio de la Fisiología de Hongos. El conocimiento de esta fase, y la trascendencia que pueda tener, es lo que nos ha llevado a centrar nuestros estudios, en los cambios químicos y fisiológicos que tienen lugar durante la fase autolítica del crecimiento de hongos filamentosos.

Según Matile (1969), la autólisis, puede ser considerada como la muerte de la célula. Las enzimas líticas, se encuentran confinadas en unos corpúsculos llamados lisosomas, donde tienen lugar los procesos líticos celulares. Cuando la célula muere, generalmente por falta de nutrientes, los lisosomas no pueden seguir regenerando su membrana lisosomal o tonoplasto, rompiéndose esta, y liberándose las enzimas líticas allí confinadas. Como consecuencia de esto sobreviene la hidrólisis de los materiales citoplasmáticos y de las paredes celulares. Esto se refleja en una pérdida gradual del peso seco del micelio, que generalmente se toma como criterio para la medida de la autólisis.

Fencel (1978), considera que la principal causa de la autólisis es, aparentemente, la pérdida del balance material existente en la hifa del hongo, causado por factores internos o externos. Los factores internos, pueden ser

la ruptura de los orgánulos o una acumulación de metabolitos tóxicos. Las causas externas, comprenden factores físicos, químicos y enzimáticos, los cuales perturban la estructura intracelular de las paredes de las hifas, y también la falta de nutrientes, especialmente de fuentes de energía. La falta de la fuente de energía, puede ser causada, porque se haya terminado esta, o por una deficiencia específica en un compartimento, debido a su localización particular en una hifa o colonia. De esta forma, puede ocurrir al azar la lisis en una parte determinada de una hifa. Por esta razón, Trinci y Righelato (1970) llegan a la conclusión de que el cultivo es citológicamente heterogeneo a todos los estados del desarrollo y que la edad del cultivo no puede ser usada como un indicador de la secuencia de los cambios morfológicos. El hecho de que existan simultáneamente dentro de una hifa compartimentos lisados y otros intactos, indica que la parte no dañada de la hifa, aparentemente utiliza sustancias de bajo peso molecular para su crecimiento; estas sustancias, provienen de las partes autolizadas. Desde este punto de vista, la autólisis, puede ser considerada como un camino de supervivencia en condiciones de inanición. El agotamiento de nutrientes en el medio, representa una de las razones más importantes para que un cultivo se autolice gradualmente.

Entre los primeros estudios sobre la autólisis, están los de Dox y Maynard (1912), atribuyendo la pérdida de turgencia que experimenta el micelio con el tiempo de incubación, a los cambios químicos que tienen lugar durante el proceso autolítico. Una serie de experimentos encami

nados a determinar como y en que extensión la autólisis - afectaba el contenido de nitrógeno del líquido de cultivo, hicieron atribuir la liberación de NH_3 durante la autólisis a la descomposición de proteínas.

En un estudio posterior, Dox (1913) llega a la - conclusión de que la autólisis tiene lugar cuando cesa el crecimiento, y esto sucede al agotarse los carbohidratos - presentes inicialmente en el medio de cultivo.

Brown (1923), estima que la autólisis sucede como consecuencia de la acumulación de metabolitos de naturaleza tóxica, y Boyle (1924) estudiando el envejecimiento de sp. de Fusarium, trata de dilucidar si este envejecimiento es de origen enzimático, aunque no obtuvo resultados concluyentes.

La primera investigación química del envejecimiento de cultivos, fué llevada a cabo por Clara Pratt en 1924, al estudiar analíticamente los productos que aparecen como resultado de la autólisis del hongo Fusarium frutigenum. Además, llega a la conclusión de que la falta de nutrientes del medio, por agotamiento de estos, y la acumulación de productos metabólicos, son dos factores de igual importancia en la reducción de la velocidad de crecimiento.

Bortels (1927), observa un paralelismo entre autólisis y una coloración rojo-violeta que aparece en el medio al ser este alcalinizado. Metz (1930), también observa una correlación entre autólisis y la aparición de un color marrón-rojizo en el medio, en 13 organismos diferen-

tes, siendo el color más intenso en presencia de Zn y Fe juntos.

Un estudio sistemático sobre la autólisis del hongo Aspergillus niger, fué llevado a cabo por Behr (1930) examinando la influencia que diversas condiciones prefijadas tenían sobre la autólisis. Midiendo la autólisis como pérdida de peso seco de micelio y solubilización del N celular, esta fué mucho más rápida en un medio fisiológicamente alcalino (pH 6-7 y NO_3Na como fuente de N) que en un medio fisiológicamente ácido (pH 1,0 y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ como fuente de N). En el mismo año (1930), Rippel y Behr, estudian la liberación del Mg durante la autólisis del Aspergillus niger, y en el año 1936, estos mismos autores, siguen la liberación de compuestos de azufre orgánico durante la autólisis de este mismo microorganismo.

Los trabajos de Woolley y Peterson (1937) versan sobre la autólisis inducida de Aspergillus sydowi. Las condiciones más favorables para la autólisis consistían en permitir que el micelio seco y molido se autolizase en presencia de timol durante 2 o 3 días. En este proceso, el 63% del nitrógeno del micelio llegaba a ser soluble en agua. Como puede verse, la gran mayoría de los trabajos efectuados sobre la fase autolítica del crecimiento en estos años, versan casi únicamente sobre la química del nitrógeno en diferentes aspectos.

Más tarde, aparecen algunos trabajos que se ocupan de la química del fósforo, siguiendo la liberación de compuestos orgánicos de este elemento, así como la mineralización de estos compuestos a ortofosfatos, y su acumula-

ción en el medio durante el proceso autolítico. Destacan los trabajos de Michel-Durand (1938) sobre la liberación de compuestos orgánicos conteniendo fósforo, así como los de Chang (1940) y Semeniuk (1944) quienes llegan a opinar que la autólisis viene marcada por la aparición de fosfatos en el medio. En años sucesivos, aparecen los trabajos de Hockenhull (1946 y 1950) y Raistrick (1948), sobre la liberación de azufre durante el proceso autolítico.

Camici, Sermoniti y Chain (1952), estudian la autólisis del micelio del Penicillium chrysogenum en cultivo sumergido, comprobando que la autólisis tiene lugar a diferentes tiempos, dependiendo de las condiciones experimentales y de la forma del micelio.

Crewther y Lennox (1953) siguen los cambios químicos que tienen lugar en el líquido de cultivo donde se había autolizado el Aspergillus oryzae, y Smithies (1953), estudia la liberación e hidrólisis de carbohidratos, proteínas y quitina del micelio de Penicillium griseofulvum, por autólisis del micelio seco o por tratamiento de este con enzimas de otras fuentes.

La variación cuantitativa y cualitativa de los aminoácidos liberados, por diversos hongos, durante la autólisis fué estudiada detalladamente por Ritter (1955), así como la influencia que tienen sobre la autólisis la adición de vitaminas al medio de cultivo.

Intentando profundizar en la autólisis del Aspergillus oryzae, Horikoshi y Sakaguchi (1958), hacen un es-

tudio de la lisis de las paredes celulares de este hongo, con una enzima lítica obtenida de Bacillus circulans.

Los trabajos de Tandon y Chandra (1962) sobre autólisis del hongo Colletotrichum gloeosporioides, ponen de manifiesto el decrecimiento gradual que experimentan los azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos existentes en el micelio a lo largo del periodo autolítico.

Emiliani y colaboradores (1957, 1958, 1959, 1962, y 1971) han estudiado ampliamente los fenómenos autolíticos que sufren las células de los hongos cuando se encuentran en determinadas condiciones desfavorables (autólisis inducida), con objeto de profundizar en el conocimiento del mecanismo de los procesos vitales. Bajo diferentes condiciones, se manifiesta la actividad de diversas enzimas - líticas (autolizantes) por la formación de azúcares, aminoácidos, etc. que se difunden en el medio.

En una serie de trabajos sobre la autólisis del Aspergillus oryzae, Arima, Uozumi y colaboradores (1965, 1968 y 1969), estudian primero las condiciones óptimas de la autólisis de este hongo, su inducción, los cambios morfológicos del micelio, así como la excrección de aminoácidos, azúcares y nucleótidos al autolizado. Posteriormente, estudian diferentes nucleasas, encontradas en el micelio de este hongo durante el proceso autolítico, así como inhibidores existentes en el mismo.

Trinci y Righelato (1970) observan en la autólisis

sis del Penicillium chrysogenum, un decrecimiento del nivel de proteínas, RNA y DNA en cultivos autolizados de este hongo. Al principio de la autólisis, la estructura granular del protoplasma se pierde, debido a la lisis ribosomal. No parece que las membranas sean afectadas durante este proceso, puesto que tienden a acumularse en el medio. Las mitocondrias son más estables que los ribosomas, probablemente debido a los fosfolípidos que contienen. Bainbridge y colaboradores (1971) llegan a conclusiones análogas a las anteriores al estudiar la autólisis del Aspergillus nidulans.

Lahoz y colaboradores (1966, 1967, y 1968) han estudiado la autólisis del Aspergillus terreus y del Aspergillus flavus, tanto en un medio fisiológicamente alcalino, como en un medio fisiológicamente ácido, así como el efecto del tipo de cultivo (sumergido o estacionario) sobre esta fase. Posteriormente, en 1969, estudiaron la autólisis inducida del Aspergillus flavus, siguiendo la liberación de NH_3 durante esta fase.

Una serie de diversos trabajos sobre la influencia de diversos parámetros en la autólisis de Aspergillus niger, como son influencia del nivel de la fuente carbonada, relación C/N, influencia de la temperatura, del pH, etc. han sido llevados a cabo por Lahoz y colaboradores en estos últimos años (1970, 1974, 1978 y 1979).

Es generalmente aceptado, que los microorganismos producen enzimas, las cuales pueden hidrolizar los políme-

ros de sus paredes, ya que estas enzimas son esenciales para el crecimiento celular (Forsberg y Rogers, 1971). Mahadevan y Mahodkar (1970), encuentran una correlación positiva entre la cantidad de enzimas líticas en la pared celular de Neurospora crassa, crecimiento apical y frecuencia de ramificación. En los hongos, se cree que estas enzimas hidrolíticas, son transportadas en vesículas hasta los puntos de las hifas donde tienen lugar las ramificaciones de las mismas. Se ha podido demostrar en ellos, la presencia de glucanasas, quitinasas y proteinasas. Las vesículas, pueden llevar a cabo el transporte de muchos de estas enzimas líticas, desde las hifas al medio. Sin embargo, las hifas contienen sus propias sustancias protectoras, mediante las cuales resisten el efecto lítico de sus propias enzimas durante el crecimiento. Wessels y Kolbin (1972), demostraron en Schizophyllum commune, que solamente después de quitar esta barrera podían actuar las glucanasas y quitinasas endocelulares, para atacar la pared.

Como parte de las hifas, las paredes celulares, también experimentan un proceso de envejecimiento o autólisis con sus propias enzimas líticas. Mitchell y Sabar, en 1966, encuentran en las paredes de Phythium enzimas líticas capaces de llevar a cabo la degradación de las mismas. Polachek y Rosenberger (1975) estudian la autólisis de las paredes aisladas de Aspergillus nidulans con las enzimas que en ellas quedan retenidas. Durante la incubación de las paredes observan liberación de glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, aminoácidos y oligosacáridos; en las primeras horas, la autólisis es lineal, pero cuando se ha hi-

hidrolizado un 3% del material de la pared, la velocidad decrece y las paredes celulares se hacen resistentes a las enzimas. Lo primero que se hidroliza, son las puntas de las hifas, lo cual no es debido probablemente a una localización específica de las enzimas líticas, sino a la menor resistencia de las paredes jóvenes al ataque. Reyes y Lahoz (1977), hacen un estudio de la lisis de las paredes celulares de diferentes edades de Sclerotinia fructigena con sus propias enzimas líticas, observando que paredes jóvenes obtenidas de cultivos no autolizados, llegan a lisarse en un 50%, mientras que las paredes obtenidas de cultivos muy autolizados no se degradan más de un 10%; entre estos dos extremos, en paredes obtenidas de cultivos de distintas edades, hay una lisis gradual.

Durante el proceso autolítico, y debido a la gran desorganización celular, hay una acumulación progresiva en el líquido de cultivo de diferentes enzimas líticas, capaces de llevar a cabo la digestión celular. Los trabajos que ponen de manifiesto la producción o excrección de enzimas líticas durante la autólisis, son abundantes en estos últimos años. Vessey y Pegg (1973) estudian la producción de quitinasa durante la autólisis del Verticillium albo-atrum. Crecientes cantidades de β -N-acetilglucosaminidasa fueron encontradas en Sclerotinia fructigena durante su autólisis, por Reyes y Byrde (1973). Un estudio sistemático sobre la variación de diversas actividades enzimáticas, - carbohidrasas, quitinasas, y fosfatasas durante la autólisis de diferentes hongos, fué llevado a cabo por Lahoz, Reyes y colaboradores (1976, 1977). También estos autores, -

en 1977 y 1979, han estudiado la influencia de las diferentes condiciones de cultivo, así como la fuente de carbono y nitrógeno sobre la variación de la actividad enzimática de las quitinasas, β -N-acetilglucosaminidasa y (1,3)- β -glucanasa durante la autólisis de Neurospora crassa, llegando a la conclusión de que cada hongo produce las enzimas líticas necesarias para degradar sus propias paredes celulares.

Como puede verse a través de la revisión llevada a cabo sobre autólisis de hongos filamentosos, nunca se ha pensado en la posibilidad, de que el proceso autolítico de hongos fitopatógenos, pudiera estar implicado en la infección de los diferentes tejidos de las plantas por estos parásitos.

La pared celular de las plantas está formada por una estructura compleja y ordenada que constituye una barrera y defiende a las células de las invasiones microbianas. Tradicionalmente la pared celular de la planta se divide en tres regiones de acuerdo con su estructura y función: Lamela media, pared primaria y pared secundaria. La lamela media es una región donde se juntan las paredes de la célula. La pared primaria tiene una organización definida, y es la más dinámica de las capas. La pared secundaria, es la porción de pared que se forma cuando ya ha terminado la elongación celular. De una región a otra varía, gradualmente, tanto la composición química como el grado de organización.

Los polisacáridos de la pared han sido históricamente agrupados en sustancias pepticas, hemicelulosas y celulosas (Northcote, 1963) basándose en la solubilidad de los polisacáridos constituyentes de la pared, mas bien que en su composición química. Las sustancias pepticas son los

principales constituyentes de la lamela media y elementos estructurales de la pared primaria (McCledon, 1964; Talmadge, 1973). Las hemicelulosas son los principales componentes de la pared media y secundaria y encadenan las fracciones pépticas y celulósicas (Baner, 1973; Northcote, 1972). La celulosa es la sustancia más abundante encontrada en el reino vegetal, y constituye el mayor componente estructural de las paredes: en la pared primaria, las fibrillas de celulosa están orientadas al azar; la pared secundaria está formada por capas de celulosa orientadas en diferentes direcciones (Mühlethaler, 1967). En las paredes de las plantas leñosas hay además, otro componente muy importante: la lignina.

Un comportamiento característico de muchos organismos fitopatógenos, es la facultad para producir una serie de enzimas capaces de degradar los polisacáridos complejos de las paredes celulares de las plantas y los constituyentes de las membranas (Bateman y Millar, 1966; Wood, 1967 y 1973; Albersheim y col., 1969; Porter, 1966; Tseng y Bateman, 1968). Por lo general, estas enzimas se producen inductivamente, son extracelulares, muy estables y están presentes en tejidos infectados (Bateman y Basham, 1976).

En la autólisis de hongos filamentosos, ha sido comprobado, que estos producen enzimas líticas que le son necesarias para degradar los polímeros de sus propias paredes celulares. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que los hongos fitopatógenos produjeran durante su autólisis, además de las enzimas líticas necesarias para degradar sus propias paredes, las enzimas líticas para degradar las paredes celulares de las plantas que parasitan.

De acuerdo con este postulado, la presente investigación se ha planificado de la siguiente manera:

- 1.- Elección de un hongo fitopatógeno que por su virulencia tenga interés en la Economía.
- 2.- Estudio de su autólisis natural, considerando terminado este proceso, cuando no haya variación en el peso seco del micelio con el tiempo de incubación.
- 3.- Variación de las actividades de las enzimas líticas implicadas en la degradación de las paredes celulares del hongo, durante su autólisis.
- 4.- Variación de las actividades de las enzimas líticas que puedan actuar sobre las paredes celulares de las plantas, durante la autólisis.
- 5.- Actuación del complejo lítico enzimático, obtenido de cultivos autolizados, sobre las paredes del hongo.
- 6.- Actuación del complejo lítico enzimático, obtenido de cultivos autolizados, sobre las hojas y el tallo de plantas de judía.
- 7.- Maceración de tejidos vegetales con este complejo enzimático.
- 8.- Localización histoquímica de la β -N-acetilglucosaminidasa (hidroliza oligómeros de N-acetilglucosamina) al microscopio óptico y al electrónico.

Botrytis cinerea.-

Las características generales que presenta esta especie, están extraídas de la bibliografía existente: Gola, 1965; Webster, 1970; y Domsch, 1972.

Este hongo pertenece a los denominados "Hongos imperfectos". Se encuentra dentro del orden de los Hiphomycetes y de la familia Mucedinaceae.

Los hongos imperfectos, no tienen ascas ni basidios. En parte pueden considerarse formas conidiales de los Ascomicetos; así Botrytis cinerea se considera que tiene la forma conidial de Sclerotinia fuckeliana (ataca los racimos de uvas y estropea el grano; a veces no resulta tan perjudicial porque provoca cierta pérdida de agua, facilitando la fermentación noble). También pueden considerarse como formas micélicas de posición sistemática desconocida. Muchos de ellos se multiplican exclusivamente por oidios, conidios, o conidiosporas, sin presentar órganos sexuales puros. Se ha considerado, que la mayoría de estos hongos son formas metagenéticas de otros hongos perfectos, que en determinados momentos de su ciclo desarrollan ascas o basidios.

El orden Hiphomycetes forma el grupo más numeroso dentro de los hongos imperfectos.

La familia Mucedinaceae, posee conidiosporas separadas entre sí, lo mismo que las hifas. En las porciones terminales, a veces se forman oidiosporas. Las hifas suelen ser hialinas o pálidas aunque a veces pueden encontrarse teñidas, al igual que los conidios o conidiosporas.

Botrytis cinerea, se desarrolla sobre las partes vegetales en descomposición. El micelio puede producir formas escleróticas. Puede atacar tomate, lechuga, fresas, cerezos, viñas, avena... Sus conidiosporas son de paredes finas; forma conidios multinucleados de forma elíptica y también microconidios.

La temperatura a la que crece este hongo es de 22 a 25°C. El rango de pH se encuentra entre 2 y 8. Es uno de los hongos de mayor actividad pectolítica; en él se ha demostrado la presencia de galacturonasas, metilesterasas y transeliminadas.

Si crece en una atmósfera baja en C_2 se comporta como una especie autotrófica.

Como productos metabólicos producidos por este hongo se conocen: ácido oxálico, una proteína de bajo Pm, urea, tiourea, fitotoxinas, etc.

MATERIALES, METODOS Y PARTE EXPERIMENTAL

MICROORGANISMO EMPLEADO

El microorganismo empleado fué el Botrytis cinerea donado por el Dr. Juan Antonio Leal del Instituto de Inmunología del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C.

Este microorganismo se mantenía en el laboratorio mediante resiembras en tubos de agar malta inclinados.

PREPARACION DEL INOCULO

Una vez que los cultivos inclinados habían crecido convenientemente (de 12 a 15 días), se preparaba una suspensión de esporas y micelio en condiciones estériles, añadiendo 10 ml de agua destilada estéril, frotando ligeramente la superficie del cultivo con el asa de siembra. Los matraces fueron inoculados con 1 ml de esta suspensión.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado tiene la siguiente composición:

| | |
|--------------------------------------------------|----------|
| Glucosa | 10 g/l. |
| Tartrato amónico | 2 g/l. |
| $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ | 1 g/l. |
| $\text{SO}_4\text{Mg}_7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g/l. |
| ClK | 0,5 g/l. |
| Extracto de levadura | 1 g/l. |
| Elementos traza | 1 ml/l. |

Asimismo, la solución de elementos traza está compuesta:

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----------|
| $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ | 100mg/l. |
|--------------------------------------------------------------------|----------|

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----------|
| $\text{SO}_4\text{Zn.7H}_2\text{O}$ | 70 mg/l. |
| $\text{SO}_4\text{Fe.7H}_2\text{O}$ | 50 mg/l. |
| $\text{SO}_4\text{Cu.5H}_2\text{O}$ | 10 mg/l. |
| $\text{SO}_4\text{Mn.4H}_2\text{O}$ | 10 mg/l. |
| $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 10 mg/l. |

Para preparar este medio, se disuelve la glucosa - en agua destilada, y a continuación se disuelven todas las - sales con excepción del $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, que se añade disuelto y en - último lugar, para evitar precipitaciones. A la mezcla se le añade la solución de elementos traza. Finalmente se complementa hasta un litro con agua destilada. El pH del medio era de 5,5.

ESTERILIZACION DEL MEDIO

El método empleado fué el de tyndalización, el cual consiste en someter el medio de cultivo contenido en los matraces, a una corriente de vapor durante media hora, tres - días consecutivos.

METODO DE CULTIVO

Los matraces utilizados, tenían 100 ml de capacidad y contenían 20 ml del medio de cultivo descrito. Una vez esterilizados , eran inoculados e incubados en estufa, mar ca Selecta, a una temperatura de 25°C, con un margen de 0,5° C. Transcurrido un periodo de tiempo conveniente y a intervalos regulares, se procedía a la toma de muestra.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES LIBRES EN EL LIQUIDO DE CULTIVO.

Método de Somogyi (1945) en combinación con el método de Nelson (1944).

Fundamento.-

Este método se basa en la oxidación de azúcares y sustancias reductoras mediante compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina.

Las sustancias reductoras son oxidadas por el SO_4Cu , el cual se reduce a óxido de cobre, rojo, que reacciona con el reactivo Nelson, formando un complejo de color azul. La intensidad de color depende de la cantidad de cobre reducido, o lo que es lo mismo, de la cantidad de sustancias reductoras existentes.

Este color se mide espectrofotométricamente a 540 nm. y dicha lectura se compara con la de un patrón de glucosa de concentración conocida.

Este método reúne las siguientes ventajas:

- 1) Es suficientemente alcalino para la determinación de la maltosa y otros azúcares de pequeña actividad.
- 2) Los reactivos son estables.
- 3) Puede usarse entre límites muy amplios, desde 10 microgramos hasta 300 microgramos de glucosa u otras sustancias de equivalente poder reductor.

Reactivos.-

Reactivo alcalino de Somogyi:

- 1º) 24 gramos de carbonato sódico anhidro, más 12 gramos de tartrato sódico potásico (sal de Rochelle) se disuelven en 250 ml. de agua destilada.
- 2º) 4 gramos de sulfato cúprico hidratado ($5 H_2O$) se disuelven en 40 ml. de agua destilada. A continuación, se agrega agitando, la primera solución.
- 3º) Sobre esta mezcla, se añaden lentamente 16 gramos de bicarbonato sódico.
- 4º) 180 gramos de sulfato sódico anhidro se disuelven en 500 ml. de agua destilada caliente y se hierve para expulsar el aire. Una vez que se enfria, se le añade la mezcla anterior y se completa el volumen hasta 1000 ml. con agua destilada. El preparado se deja en la obscuridad a $30^{\circ}C$, y al cabo de una semana se filtra y se guarda en frasco topacio.

Reactivo de Nelson:

- 1º) A 25 gramos de molibdato amónico, disueltos en --- 450 ml. de agua destilada, se añaden cuidadosamente 21 ml. de ácido sulfúrico concentrado, agitando al mismo tiempo.
- 2º) Se disuelven 3 gramos de arseniato sódico en 25 ml. de agua destilada. A continuación, se mezclan ambas soluciones y el preparado resultante se guarda en la estufa a $37^{\circ}C$ durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, el reactivo se guarda en frasco topacio.

Procedimiento.-

Una cantidad conocida de líquido problema, se lleva hasta 1 ml. con agua destilada, y se añade 1 ml. de reactivo de Somogyi. Se agita y se calienta al baño maría, dejándolo hervir durante 15 minutos. A continuación se enfria y se agrega 1 ml. de reactivo Nelson. Se agita de nuevo y se completa el volumen hasta 15 ml. con agua destilada. El color que aparece en los tubos permanece estable durante horas. La absorción se mide en un espectrofotómetro Unicam, modelo S P 500, a una longitud de onda de 540 nm. Este método también se usó reduciendo a un quinto cada uno de los volúmenes totales.

Como el desarrollo del color depende de varios factores, tales como el tiempo y la intensidad de calentamiento es conveniente asegurarse que estos han sido correctos. Para ello, al mismo tiempo que se realiza el ensayo con el problema, se hace también con un patrón de glucosa y se llevan --- blancos de reactivo y de problema.

Solución patrón de glucosa.-

Se prepara una solución 1 mM de glucosa Analar. Para ello se disuelven 18,0 mg. de este compuesto y se llevan a 100 ml. con agua destilada en matraz aforado. Se conserva congelado en nevera. Cuando es necesario el patrón de glucosa se disuelve en el tampón adecuado.

Curva patrón de glucosa.-

A partir de la solución patrón de glucosa, cuya -- preparación se acaba de describir, se toman distintos volúmenes y se completan con agua destilada hasta 1 ml., siguiendo

a continuación el método indicado.

La curva patrón se representa gráficamente llevando en abscisas las distintas concentraciones de glucosa tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas al leer a la longitud de onda de 540 nm. (Fig.1)

| <u>Volumen (ml)</u> | <u>Concentración (μmoles)</u> | <u>Lectura (U.A.)</u> |
|---------------------|----------------------------------------------|-----------------------|
| 0,05 | 0,05 | 0,060 |
| 0,1 | 0,1 | 0,082 |
| 0,2 | 0,2 | 0,160 |
| 0,3 | 0,3 | 0,230 |
| 0,4 | 0,4 | 0,290 |
| 0,5 | 0,5 | 0,360 |
| 0,6 | 0,6 | 0,440 |
| 0,7 | 0,7 | 0,495 |
| 0,8 | 0,8 | 0,545 |
| 0,9 | 0,9 | 0,625 |
| 1,0 | 1,0 | 0,690 |

Curva patron de glucosa

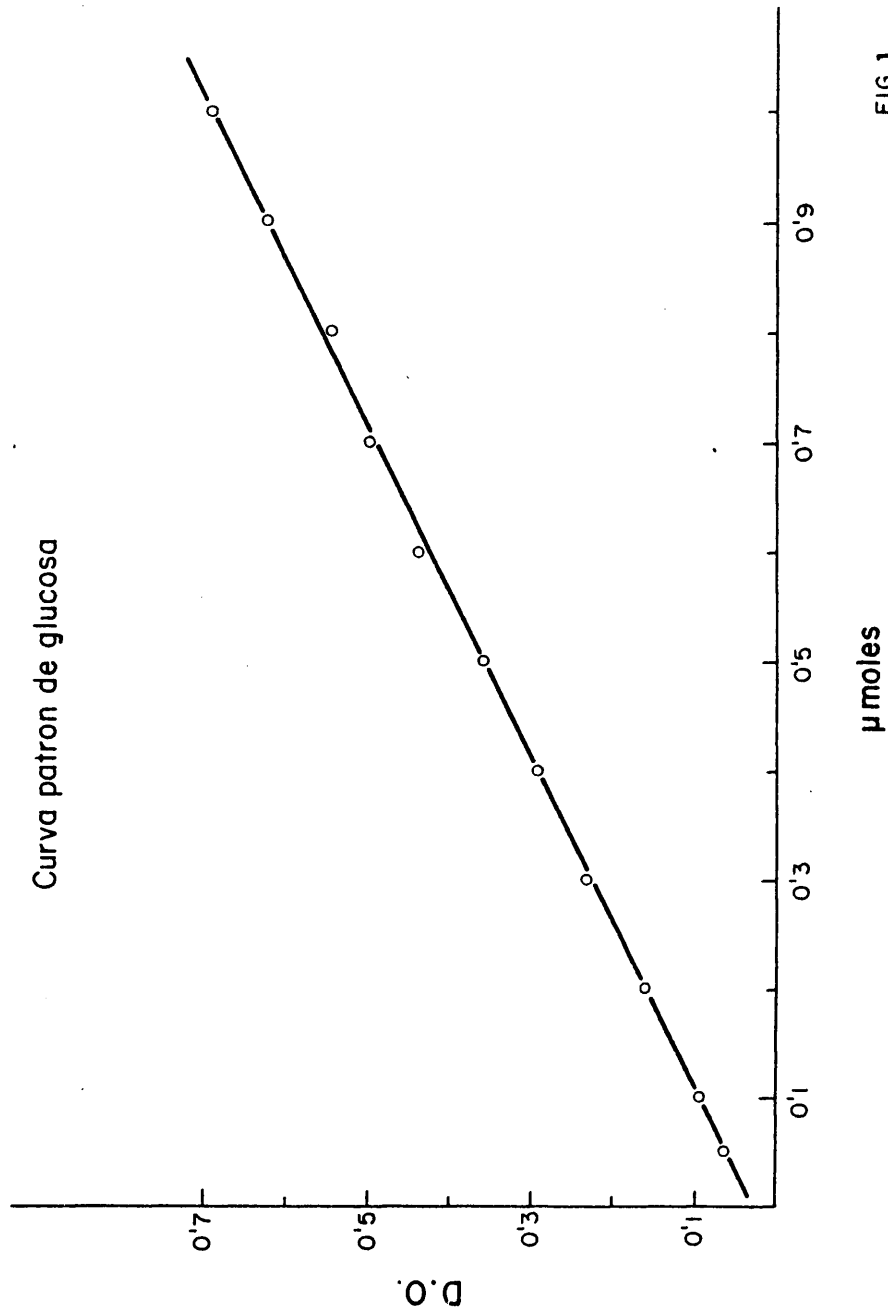


FIG. 1

DETERMINACION DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO

Método de Lowry y col. (1951).

Reactivos empleados.-

- Reactivo A: CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 N.
- Reactivo B: $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 0,5%.
- Reactivo B': Tartrato sódico potásico al 1%.
- Reactivo C: Solución alcalina de cobre. Se mezclan 50 ml. de reactivo A con 0,5 ml. de reactivo B y 0,5 ml. de reactivo B'.
- Reactivo D: Reactivo de Folin-Ciocalteu (1929) diluido -- (1:1) con agua destilada.

Procedimiento.-

Tomando distintos volúmenes del líquido problema se completan a 0,6 ml. con agua destilada. A continuación se añaden 3 ml. de reactivo C y se dejan los tubos en estufa a 37°C durante 20 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo se añade a cada tubo 0,3 ml. del reactivo Folin-Ciocalteu diluido (1:1) con agua destilada. Los tubos se ponen a incubar de nuevo en estufa a 37°C durante 30 minutos. La densidad óptica se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

En cada determinación de proteínas, se coloca un tubo patrón, con una cantidad determinada de la solución patrón de proteínas, junto con el tubo de blanco de reactivo.

Solución patrón de proteínas.-

Se prepara una solución patrón de albúmina bovina cristalizada (Armour, Chicago, U.S.A.), que contenga 1 mg/ml.

Para ello se pesan 100 mg. de albúmina bovina y se disuelven y llevan a 100 ml. con agua destilada.

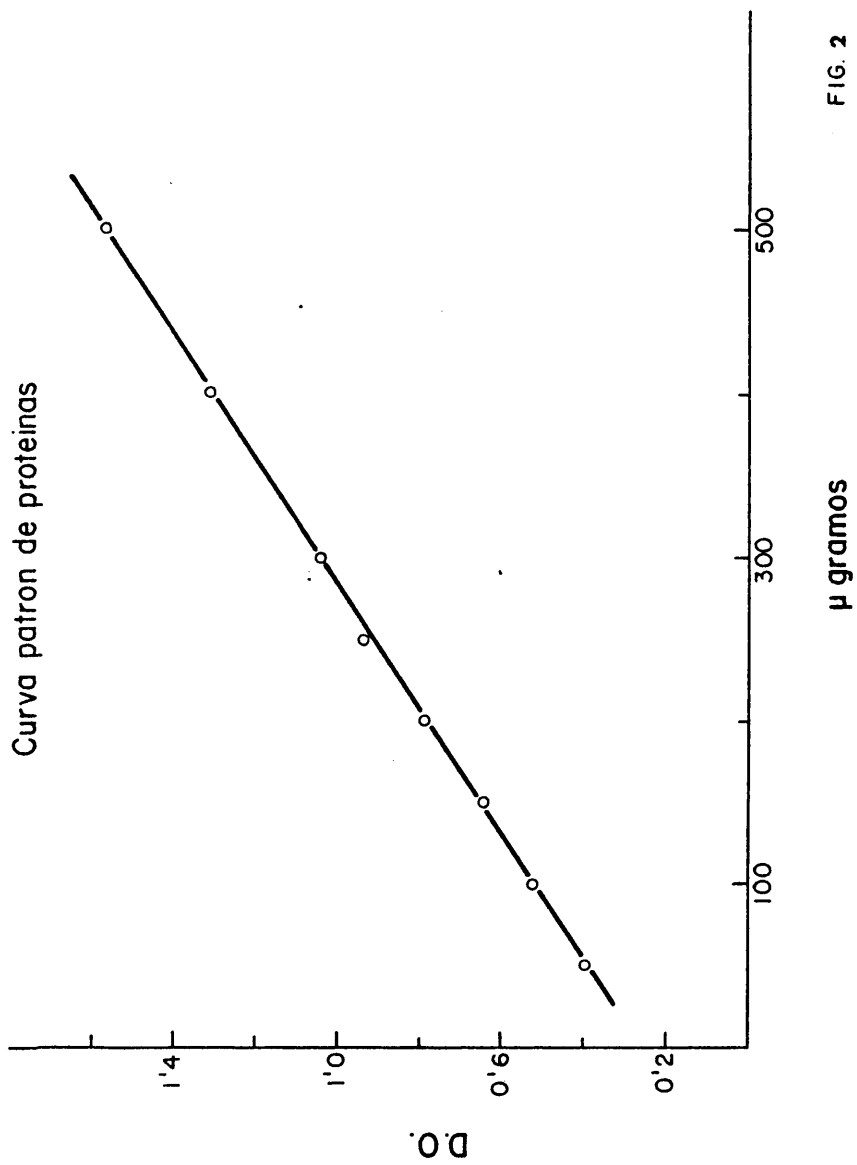
La solución así preparada, se conserva congelada - en nevera.

Curva patrón de proteínas.-

A partir de la solución patrón de albúmina bovina anterior, se toman distintos volúmenes y se procede como se ha descrito en el método.

Representando gráficamente en abscisas las distintas concentraciones de albúmina tomadas, y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas, representamos la curva patrón de proteínas. (Fig.2).

| <u>Volumen (ml)</u> | <u>Concentración (μg.)</u> | <u>Lectura (U.A.)</u> |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|
| 0,05 | 50 | 0,39 |
| 0,10 | 100 | 0,52 |
| 0,15 | 150 | 0,64 |
| 0,20 | 200 | 0,80 |
| 0,25 | 250 | 0,97 |
| 0,30 | 300 | 1,05 |
| 0,40 | 400 | 1,34 |
| 0,50 | 500 | 1,57 |



PREPARACION DE SOLUCIONES TAMPON

Tampón de Citrato-Fosfato-Borato.-

Teorell y Stenhagen (1938). Válido para un rango de pH entre 2 y 12 unidades.

Reactivos empleados:

- Solución A: Se pesan 7 gramos de ácido cítrico hidratado y se disuelven en 100 ml. de agua destilada. Por otro lado se disuelven en 100 ml. de ácido fosfórico al 85% en 100 ml. de agua destilada y se añaden a la solución anterior. A esta mezcla se le agregan 3,54 gramos de ácido ortobórico cristalizado y 343 ml. de una solución de NaOH 1 N. diluyendo el total hasta 1 litro con agua destilada.
- Solución B: Ácido clorhídrico 0,1 N.

Para obtener la solución tamponada a distintos pH, se mezclan: 20 ml. de la solución A con X ml. de la solución B, llevándose a 100 ml. con agua destilada. La cantidad X -- viene dada en las tablas (Tablas científicas-Documenta Geigy J.R. Geigy, S.A., Basilea, Suiza, 1965).

Para obtener el tampón de pH 5,5 y molaridad 50 mM se mezclan 20 ml. de la solución A con 42 ml. de la solución B y se lleva a 100 ml. con agua destilada, comprobando el pH en un medidor eléctrico de pH (Beckman, modelo "Zeromatic---S.S.3"). Si el pH no sale exacto, se corrige con una pequeña adición de la solución A o B según los casos, para obtener el pH deseado. Para obtener la solución 50mM, llevamos la -- mezcla a 200 ml. con agua destilada.

Tampón de Borato de Clark y Lubs.- (1917)

Válido para un rango de pH entre 7,8 y 10,0 unidades.

- Solución A: Acido bórico 0,1 M en cloruro potásico 0,1 M (6,2 gramos de BO_3H_3 y 7,46 gramos de KCl en 1 litro de agua destilada).
- Solución B: Hidróxido sódico 0,1 N.

Para obtener un pH de 9,8 mezclamos 50 ml. de la solución A con 40,8 ml. de la solución B, completando a 100 ml. con agua destilada.

Tampón Acetato de Walpole.- (1914)

Válido para un rango de pH entre 3,6 y 5,6 unidades.

- Solución A: Acido acético 0,2 M. (12 gramos de ácido acético en 1 litro de agua destilada o 11,4 ml. por litro de agua).
- Solución B: Acetato sódico 0,2 M. (16,4 gramos de acetato sódico anhidro en 1 litro de agua destilada o 27,2 gramos de acetato sódico con 3 moléculas de agua).

Para obtener un pH de 5,5 se mezclan 6,8 ml. de la solución A con 42,7 ml. de la solución B, completando el volumen hasta 100 ml. con agua destilada. La concentración que posee este tampón así preparado es de 0,1 M.

Tampón de citrato de Sorensen.-

Válido para un rango de pH entre 5 y 6,8 unidades.

- Solución A: Citrato disódico 0,1 M (21 gramos de ácido cítrico en 200 ml. de NaOH 1 N, diluido a un litro.
- Solución B: Hidróxido sódico 0,1 N.

Para obtener un pH de 5,2, mezclamos 85 ml. de la solución A con 15 ml. de la solución B. Si el pH no sale exacto, se corrige con una pequeña adición de la solución A o B, según los casos, para obtener el pH deseado.

Tampón de fosfato de Sorensen.-

Válido para un rango de pH entre 5 y 8,2 unidades.

- Solución A: Fosfato monopotásico 1/15 M (9,8 gramos de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ en 1 litro de agua destilada).
- Solución B: Fosfato disódico 1/15 M (17,933 gramos de PO_4HNa_2 en 1 litro de agua destilada.

Para obtener un pH de 7,3 unidades, mezclamos 90 ml de solución B, con 10 ml. de solución A.

Para obtener un pH de 7,4 unidades, mezclamos 91 ml de solución B, con 9 ml. de solución A.

Para obtener un pH de 7,6 unidades, mezclamos 94 ml de solución B, con 6 ml. de solución A.

Si el pH no saliera exacto, se corrige con una pequeña adición de solución A, o B, según los casos, para obtener el pH deseado.

Tampón de Palade.-

Este tampón consta de 3 soluciones en distintas proporciones:

Sol. A) Acetato sódico 0,14 M.
Acetato sódico..... 1,904 g.
Agua destilada..... 100 c.c.

Sol. B) Solución de veronal sódico...
Veronal sódico 2,58 g.
Agua destilada 100 c.c.

Sol. C) ClH 0,1 N.

El tampón se obtiene mezclando:

10 c.c. de solución A.

10 c.c. de solución B.

10 c.c. de solución C.

20 c.c. de agua destilada.

VALORACION DE ENZIMAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO

β -N-Acetilglucosaminidasa.- (E.C.3.2.1.30)

(β -2-acetamido-2-deoxi-D-glucósido acetamido de--oxi-hidrolasa). Hidroliza los β -fenol-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucósidos en fenol, más 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa.

Método de Wollen (1961).

Reactivos empleados:

- Tampón de Clark y Lubs de pH 9,8.
- Tampón de citrato-Fosfato-Borato de pH 5,5.
- Sustrato.

Preparación del sustrato de la β -N-acetilglucosaminidasa.-

Se prepara una solución 0,45 mM, para lo cual se pesan 15,2 mg. de p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido, de fórmula empírica $C_{14}H_{18}N_2O_8$ y peso molecular 342,30, se disuelven en 100 ml. de tampón citrato-fosfato-borato de pH 5,5 50 mM. Este sustrato se conserva congelado y en frasco tapado.

La actividad de la enzima se sigue por la hidrólisis del p-nitrofenol-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Procedimiento.-

0,1 ml. del líquido de cultivo con 0,9 ml. de sustrato, se incuban a 37°C un tiempo determinado, llevando también blancos de líquido de cultivo y sustrato. La reacción -

se para por la adición de 2 ml. de tampón de borato de Clark y Lubs de pH 9,8 0,1 M. El nitrofenol liberado desarrolla un color amarillo, leyendose en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Para poder calcular la actividad de la enzima, que corresponde a una determinada lectura, es necesario hacer -- previamente una curva patrón de p-nitrofenol.

Curva patrón de p-nitrofenol.-

Se prepara una solución 2 mM (27,8 mg en 100 ml. - de agua destilada), a partir de la cual se hacen diluciones para cubrir un amplio rango de concentraciones, y se representa gráficamente, llevando en abscisas las distintas concentraciones de p-nitrofenol tomadas, y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig.3).

Solución A: Se toman 0,5 ml. de la solución de p-nitrofenol 2 mM. y se diluye a 10 ml. con agua destilada.

Solución B: 1 ml. de la solución 2 mM. de p-nitrofenol se diluye a 10 ml. con agua destilada.

Solución C: 2 ml. de la solución 2 mM de p-nitrofenol se diluyen a 10 ml. con agua destilada.

| <u>Volumen (ml)</u> | <u>Concentración (μmoles)</u> | <u>Lectura (U.A.)</u> |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A: 0,05 | 0,005 | 0,020 |
| 0,10 | 0,010 | 0,060 |
| 0,20 | 0,020 | 0,100 |
| 0,30 | 0,030 | 0,155 |
| 0,40 | 0,040 | 0,200 |
| 0,50 | 0,050 | 0,280 |
| 0,60 | 0,060 | 0,310 |
| 0,70 | 0,070 | 0,350 |
| 0,80 | 0,080 | 0,390 |
| 0,90 | 0,090 | 0,440 |
| 1,00 | 0,100 | 0,500 |
| B: 0,60 | 0,120 | 0,610 |
| 0,70 | 0,140 | 0,700 |
| 0,80 | 0,160 | 0,790 |
| 0,90 | 0,180 | 0,920 |
| 1,00 | 0,200 | 1,000 |
| C: 0,60 | 0,240 | 1,210 |
| 0,70 | 0,280 | 1,400 |
| 0,80 | 0,320 | 1,610 |
| 0,90 | 0,360 | 1,810 |
| 1,00 | 0,400 | 2,010 |

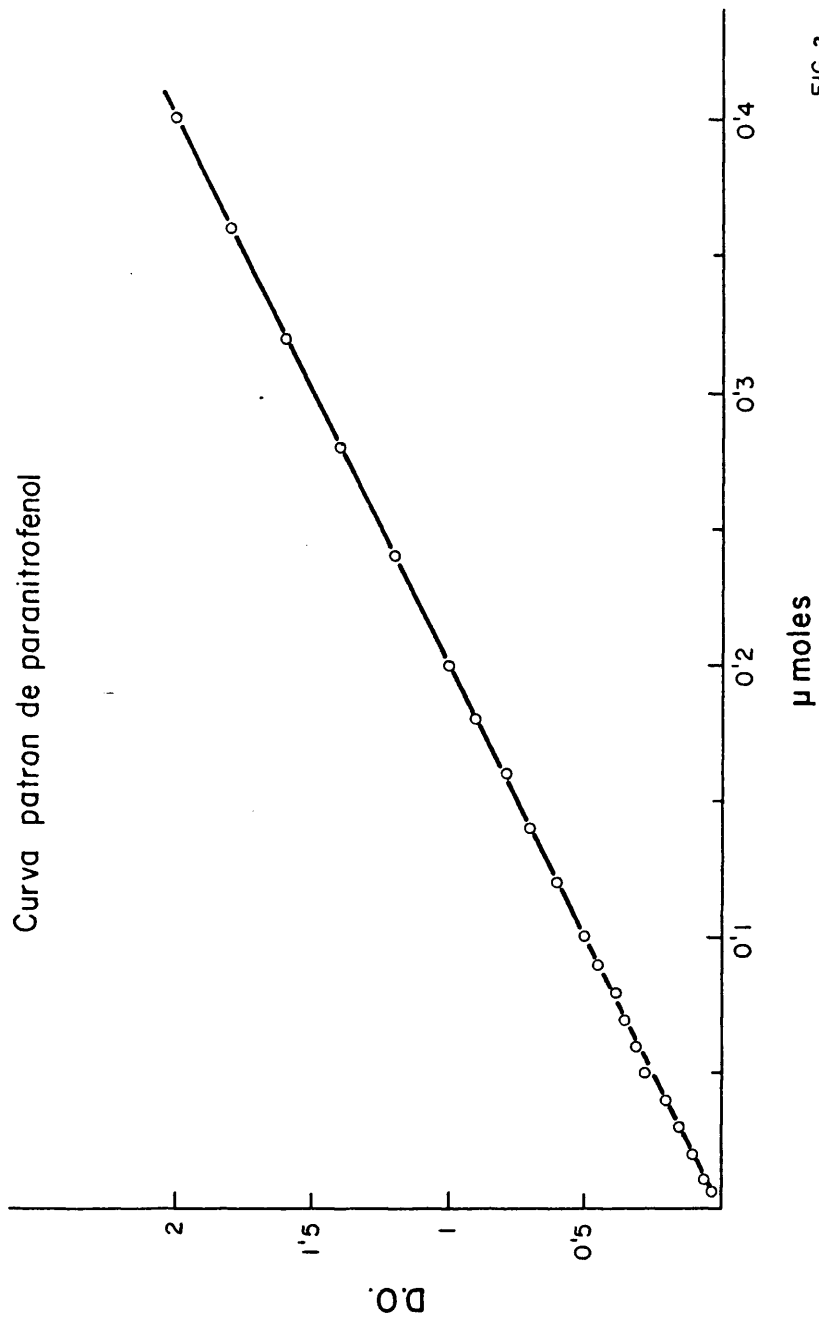


FIG. 3

Quitinasa .- (E.C.3.2.1.14.)

(β -(1-4) poli-N-acetilglucosaminidasa). Hidroliza enlaces β -(1,4)-acetamido-2-deoxi-D-glucósido en la quitina y quitodextrina.

La actividad de esta enzima se valora por la liberación de N-acetilglucosamina producida al hidrolizar la quitina coloidal.

Una unidad de actividad quitinásica es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de N-acetilglucosamina por minuto.

Reactivos empleados.-

- Solución de borato sódico saturada.
- Reactivo de Ehrlich: 2 gramos de p-dimetil amino benzaldehído, disueltos en 100 ml. de ácido acético glacial y 5 ml. de ClH concentrado.
- Acético glacial.
- Sustrato: quitina coloidal.

Obtención de la quitina de gambas.-

Método de Jeuniaux (1966).

- 1.- Los caparazones de gambas se tienen un par de horas lavándose con un detergente, para eliminar las partículas residuales.
- 2.- Se lavan varias veces, por centrifugación, con agua destilada hasta eliminar completamente el detergente.
- 3.- Se trata con ClH 1 N., agregando poco a poco y con agitación hasta que deje de desprender CO₂, lo cual nos indica una eliminación total del carbonato que contiene.
- 4.- Lavar con agua nuevamente.
- 5.- Se mantiene a 100°C al baño maría, con NaOH 0,5 N. duran

te media hora. El hidróxido sódico extrae casi todo el pigmento y la quitina queda de color sonrosado.

- 6.- Lavar por centrifugación hasta eliminar la sosa.
- 7.- Tratar con MnO_4K al 0,5% a 60°C durante 20 minutos. La materia orgánica se pone marrón.
- 8.- Lavar hasta la desaparición del MnO_4K .
- 9.- Tratar con $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$ a media saturación (como agente de -- blanqueo).
- 10.- Se lava hasta la desaparición del piro sulfito.
- 11.- Lavar con agua hirviendo para separar la arenilla que pudiera contener, repitiendo esta operación hasta la total eliminación de ésta.
- 12.- Tratar 30 minutos, con alcohol, para extraer los lípidos.
- 13.- Lavar con agua destilada.
- 14.- Se tritura en medio acuoso con una trituradora (Omni-mixer).
- 15.- Centrifugar.
- 16.- Lavar con acetona y secar.

Preparación de quitina coloidal.-

A 200 mg. de quitina, se añade una mezcla de 5 ml. de agua y 6,4 ml. de ácido sulfúrico concentrado, agitando y enfriando.

Una vez disuelta la quitina, se añade agitando, a 108 ml. de etanol acuoso frío, al 50%.

La quitina precipita, se centrifuga y se lava con agua destilada fría hasta que el pH sea aproximadamente de 5. Después se centrifuga de nuevo y se recoge el precipitado. Esta masa amorfa, se guarda en nevera, a 4°C, para preparar una suspensión en el momento oportuno.

Curva de peso seco.-

Se utiliza para determinar la cantidad de quitina. Se prepara una suspensión de quitina coloidal en agua destilada. Se cogen 0,5 ml. y 1 ml. y se ponen en dos pesasustancias previamente tarados. Se ponen a secar en estufa a 70°C durante 24 horas; a continuación se pasan a un desecador hasta alcanzar peso constante, y se vuelven a pesar. La diferencia de peso nos da los microgramos por mililitro de quitina que hay en esta suspensión.

De esta suspensión se toman distintos volúmenes y se llevan a 3 ml. con agua destilada, leyéndose en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. La curva se representa gráficamente, llevando en abscisas los microgramos de quitina y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas (Fig.4).

| <u>Volumen (ml.)</u> | <u>Concentración (µg.)</u> | <u>Lectura (U.A.)</u> |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| 0,2 | 26,7 | 0,005 |
| 0,4 | 53,3 | 0,010 |
| 0,6 | 80,0 | 0,015 |
| 0,8 | 106,7 | 0,020 |
| 1,2 | 133,3 | 0,025 |
| 1,4 | 156,0 | 0,030 |

Adaptación del método.-

A la enzima, (1 ml. del líquido de cultivo) se le añade 1 ml. de la suspensión coloidal de quitina disuelta en tampón citrato-fosfato-borato de pH 5,5, 0,05 M., que contiene aproximadamente 100 µgramos de quitina. Esta concentración la obtenemos, con ayuda de la gráfica anterior.

La enzima, más la solución de quitina, se incuban

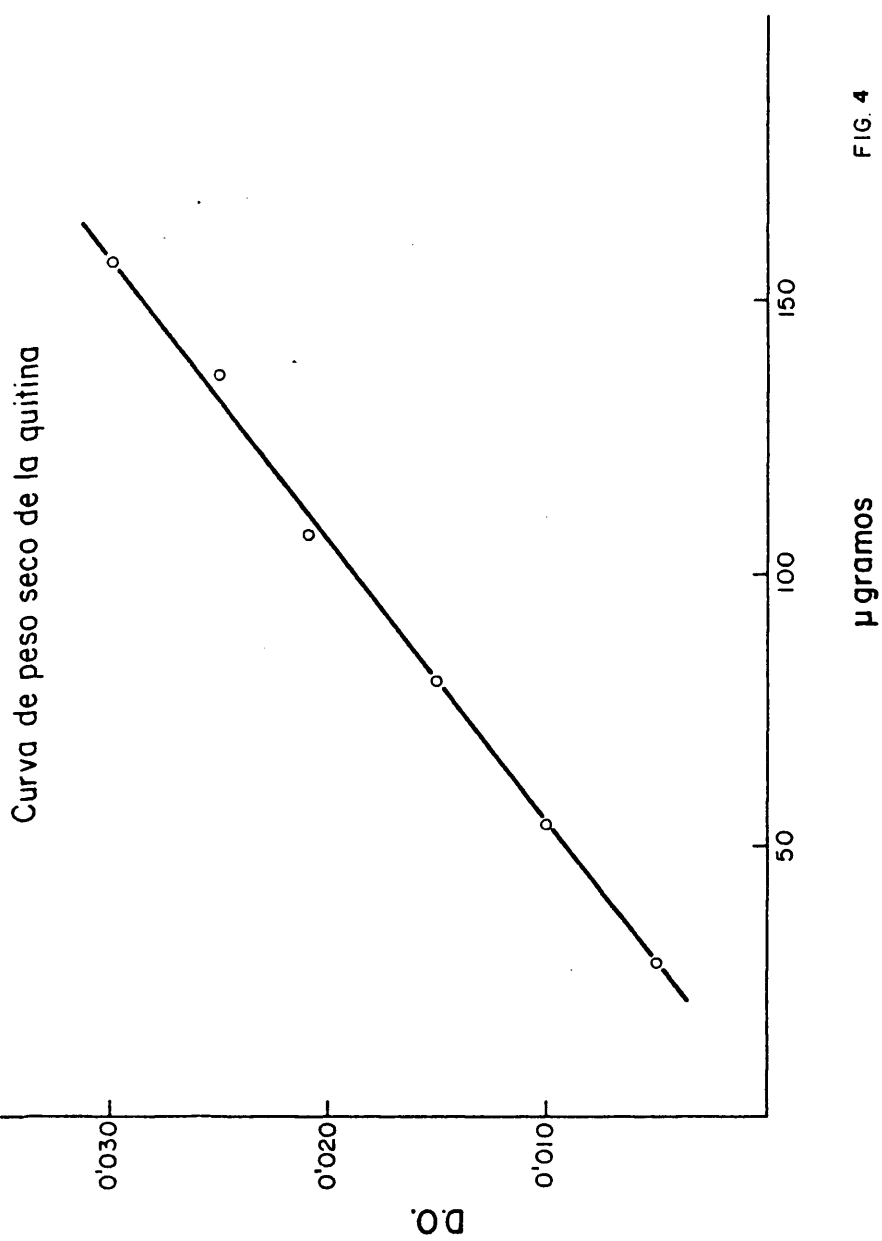


FIG. 4

a 37°C durante un tiempo determinado. A continuación se filtra esta solución para eliminar la quitina restante y parar la reacción.

Una unidad de actividad quitinásica es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de N-acetilglucosamina por minuto.

Valoración de N-acetilglucosamina.-

Método de Tracey (1934).

De una solución que contiene N-acetilglucosamina, se toman 0,3 ml. y se añaden 0,1 ml. de una solución saturada de borato sódico, calentando a ebullición durante 7 minutos. Se deja enfriar y se añaden 3 ml. de ácido acético glacial, más 0,3 ml. de reactivo de Ehrlich. Se deja una hora a temperatura ambiente, para que se desarrolle un color violeta, que será más o menos intenso dependiendo de la cantidad de N-acetilglucosamina existente. Se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Junto con el tubo problema, se llevan siempre de forma paralela un patrón y blancos de reactivo y problema.

Curva patrón de N-acetilglucosamina.-

A partir de la solución patrón de N-acetilglucosamina (2,21 mg. hasta 100 ml de agua destilada), se toman distintos volúmenes y se sigue el método anterior.

Representamos graficamente la curva patrón llevando en abscisas las distintas concentraciones tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas.(Fig.5)

41.

| <u>Volumen (ml.)</u> | <u>Concentración (μmoles)</u> | <u>Lectura (U.A.)</u> |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 0,05 | 0,005 | 0,020 |
| 0,10 | 0,010 | 0,037 |
| 0,15 | 0,015 | 0,050 |
| 0,20 | 0,020 | 0,070 |
| 0,25 | 0,025 | 0,083 |
| 0,30 | 0,030 | 0,100 |

Reactivos empleados.-

- 1.- Solución de borato sódico saturada.
- 2.- Reactivo de Ehrlich: 2 gramos de p-dimetil-amino benzal--
dehido, disueltos en 100 ml. de ácido acético glacial y -
5 ml. de ClH concentrado. Se guarda en frasco topacio.
- 3.- Acido acético glacial.

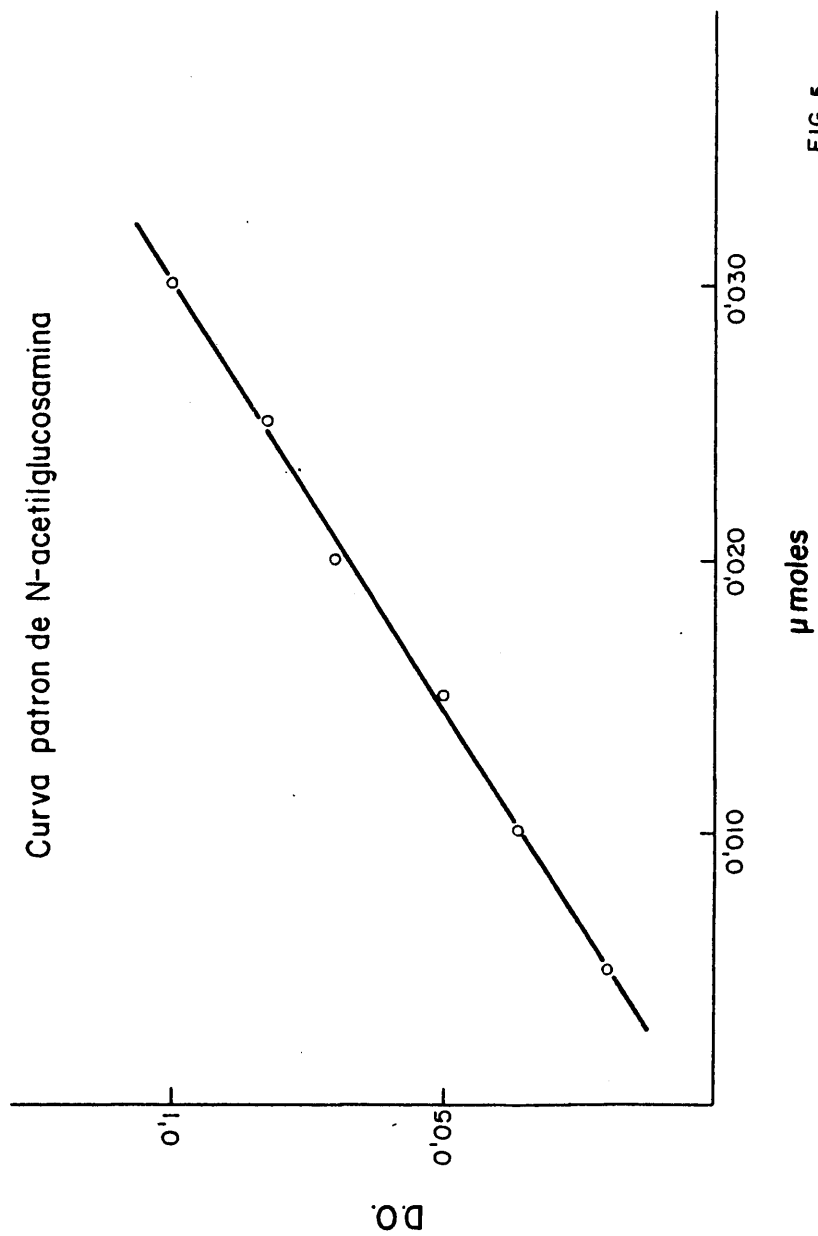


FIG. 5

Valoración de la Fosfatasa.-

(Ortofosfato monoester fosfohidrolasa). Hidroliza - los monoesteres ortofosfóricos en alcohol y ortofosfato.

Método de Brightwell y Tappel (1968).

Una unidad de actividad fosfatásica es la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Fosfatasa ácida.- (E.C.3.1.3.2)

El sustrato utilizado fué el p-nitrofenil ortofosfato disódico 3 mM, disuelto en tampón de citrato-fosfato-borato 0,1 M, pH 3,5. Se guarda en frasco tapado en nevera.

Fosfatasa alcalina.- (E.C.3.1.3.1.)

El sustrato utilizado fué el p-nitrofenil ortofosfato disódico 4 mM, disuelto en tampón de citrato-fosfato-borato 0,1 M, pH 9,5. Se guarda en frasco tapado en nevera.

Procedimiento.-

Se incubó 0,1 ml. de líquido de cultivo con 0,9 ml. de sustrato a 37°C durante un tiempo determinado, llevando simultáneamente blancos de líquido de cultivo y de sustrato. La reacción se para con la adición de 2 ml. de tampón de Clark y Lubs de pH 9,8.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de p-nitrofenol liberada, la cual se determina colorimétricamente, leyéndose en el espectrofotómetro a 420 nm. Se hace referencia a la curva patrón de p-nitrofenol, anteriormente indicada.

(1,3)- β -Glucanasa.- (E.C. 3.2.1.6.)

(1,3)- β -Glucan, glucano hidrolasa. Hidroliza enlaces (1,3)- β -Glucano adyacentes.

Su actividad se determina en el método basado en el de Mc Lellan (1970).

Sustrato: Laminarina. Se prepara una solución de laminarina a una concentración final de 1mg/0,9 ml en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,0. A continuación, para ayudar a su disolución, se calienta a 50°C al baño maría, repitiendo esta operación siempre que se va a utilizar esta solución.

Procedimiento: De este sustrato, así preparado, se ponen a incubar 0,9 ml con 0,1 ml de líquido de cultivo a 37°C, durante un tiempo determinado, llevando paralelamente con el problema blancos de líquido de cultivo y de sustrato.

La actividad de esta enzima, se determina por la liberación de glucosa, la cual se mide siguiendo el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad glucanásica se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de glucosa por minuto.

Invertasa.- (E.C. 3.2.1.26.)

(β -D-fructofuranósido fructohidrolasa). Hidroliza enlaces β -D-fructofuranósidos en glucosa más D-fructosa.

Método de Metzenberg, 1962.

Sustrato: Sacarosa. Se prepara una solución que contenga 1mg/0,9 ml para lo cual se pesan 55,5 mg de sacarosa y se disuelven en 50 ml de tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5.

Procedimiento: La presencia de invertasa en el líquido de cultivo, se mide por la hidrólisis de la sacarosa. Un volumen de 0,9 ml de sustrato, se pone a incubar con la enzima (0,1 ml de líquido de cultivo) a 37°C, durante un tiempo determinado.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de glucosa liberada, la cual se determina colorimétricamente, por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad invertásica se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de glucosa por minuto.

Celulasa.- (E.C. 3.2.1.4.)

(1,4)- β -glucano, glucanohidrolasa. Hidroliza enlaces (1,4)- β -glucano en celulosa.

Método de Trager (1932) y Ziese (1931).

Sustrato: Carboxi-metil celulosa sódica. Se prepara una solución de carboximetil celulosa sódica que contenga 1mg/0,9 ml de tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5.

Procedimiento: Se sigue el mismo procedimiento que en las enzimas anteriormente expuestas, midiendo la cantidad de glucosa liberada por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad celulásica, se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de glucosa por minuto.

α -amilasa.- (E.C. 3.3.1.1.)

(1,4)- α -glucan-4-glucanohidrolasa. Hidroliza enlaces (1,4)-glucano en polisacáridos que contienen 3 o más unidades de D-glucosa con enlaces (1,4).

Método de Summer y Howell, 1935.

Sustrato: Almidón soluble. Se prepara una solución de almidón soluble (1mg/0,9 ml) en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,0. Para ayudar a la disolución del sustrato, se calienta a 80°C al baño maría, repitiéndose esta operación siempre que se va a utilizar esta solución.

Procedimiento: Se sigue el mismo procedimiento - que en las enzimas anteriores, midiendo la cantidad de glucosa liberada por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de glucosa por minuto.

(1,6)- β -Glucanasa.- (E.C. 3.2.1.6.)

(1,6)- β -glucano, glucanohidrolasa. Hidroliza enlaces (1,6)- β -glucano adyacentes.

Sustrato: Postulan. Se prepara una solución de - este sustrato, a una concentración final de 1m/0,9 ml en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5.

Procedimiento: Para determinar la actividad de esta enzima se sigue el mismo procedimiento que para las enzimas anteriores, midiéndose la cantidad de glucosa liberada por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad enzimática se define, como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de glucosa por minuto.

(1,4)(1,3)- β -Glucanasa.- (E.C. 3.2.1.6.)

(1,4)(1,3)- β -glucano, glucanohidrolasa. Hidroliza enlaces (1,4)- β -glucano adyacentes a (1,3)-B.

Sustrato: Lichenan. Se prepara una suspensión de Lichenan a una concentración final de $\text{mg}/0,9 \text{ ml}$ en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5.

Procedimiento: La actividad de esta enzima se determina por la cantidad de glucosa liberada, según el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad enzimática se define, como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de glucosa por minuto.

Dextranasa.- (E.C. 3.2.1.11.)

(1,6)- β -glucan-6-glucanohidrolasa. Hidroliza enlaces (1,6)- β -glucano adyacentes.

Sustrato: Dextrano. Se prepara una solución de dextrano T_{10} ($P_m=10000$) a una concentración final de mg por $0,9 \text{ ml}$ en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5.

40.

Procedimiento: La actividad de esta enzima se de
termina por la cantidad de glucosa liberada, según el méto
do de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad enzimática se define, co
mo la cantidad de enzima necesaria para que se libere un
 μmol de glucosa por minuto.

Galacturonasas.- (E.C. 3.2.1.15.)

(Poli- α -(1,4)-D-galacturónido glucano hidrolasa).

Hidroliza enlaces α -(1,4)-D-galacturónidos en pectinas y otros galacturónidos. (Advances in carbohydrate chemistry - and biochemistry. Academic Press. 33, 1976).

a) Poligalacturonasa.-

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a concentración final de 1mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 2,5.

Procedimiento: La actividad de esta enzima viene dada, por la cantidad de ácido galacturónico liberado, la cual se valora colorimetricamente por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad poligalacturonásica, es la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de ácido galacturónico por minuto.

b) Polimetilgalacturonasa.-

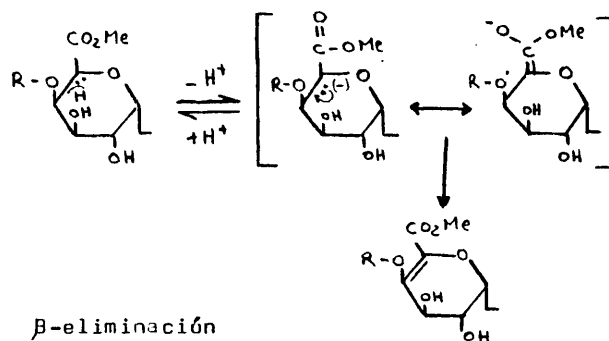
Sustrato: Pectina de manzana, a concentración final de 1mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,0.

Procedimiento: Se sigue el mismo método, midiendo la cantidad de sustancias reductoras liberadas.

Una unidad de polimetilgalacturonasa, es la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de sustancias reductoras por minuto.

Pectinliasas.- (E.C. 4.2.2.10.)

Poli (metil-D-galacturónido)liasa. Hidrolizan enlaces α -D-(1,4) de las cadenas glicosílicas de D-galacturónidos por el mecanismo de B-eliminación. (Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Academic Press. 33, 1976).



a) Exopectin-liasa.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentración final de 1mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 8,0.

Procedimiento: Se incubó 0,1 ml de líquido de cultivo con 0,9 ml. de sustrato a 37°C, durante un tiempo determinado, llevando simultaneamente blancos de líquido de cultivo y de sustrato. La actividad enzimática viene dada por la cantidad de urónidos liberados, la cual se deter

mina espectrofotometricamente a 240 nm, midiendo el incremento de absorción (U.A. antes y después de que se produzca la reacción).

Una unidad de actividad enzimática, se define, como la cantidad de enzima que produce un μmol de urónidos insaturados en 1 minuto, basado en el coeficiente de extinción molar de 4600 para estas sustancias. (Método de Hislop, Keon y Fielding, 1979, que se basa en el método de Nagel y Anderson, 1965.)

b) Endopectinliasa. -

Sustrato: Pectina de manzana, a concentración final de 1mg por ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 3,5.

Procedimiento: Se incubó 0,5 ml de líquido de cultivo, con 4,5 ml de sustrato a 37°C, durante un tiempo determinado, llevando simultáneamente blancos de líquido de cultivo y de sustrato.

La actividad enzimática se determinó midiendo el decrecimiento de la viscosidad a 30°C, en un viscosímetro capilar (Cannon-Fenske, serie 50).

Una unidad de actividad enzimática, se define, como la cantidad de enzima que cataliza un decrecimiento en la viscosidad de un 1%. (Keen y Horton, 1966).

Exopectatoliase.- (4.2.2.9.)

Poli-(1,4)- α -galacturónico exoliase. Hidroliza en la-
ces α -D-(1,4) de las cadenas glicosílicas de D-galacturó-
nidos por el mecanismo de β -eliminación.

Sustrato: Galacturonato sódico, a concentración final de 1 mg
por ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de
pH 5,5.

Procedimiento: Se incubó 0,1 ml de líquido de cultivo con 0,9
ml de sustrato a 37°C, durante un tiempo determina-
do, llevando simultáneamente blancos de cultivo y
de sustrato.

La actividad enzimática, viene dada por la cantidad
de urónidos liberados, la cual se determina espec-
trofotométricamente a 240 nm, midiendo el incremen-
to en la absorción (U.A. antes y después de que se
produzca la reacción).

Una unidad de actividad enzimática se define, como
la cantidad de enzima que produce un μ mol de uróni-
dos insaturados en un minuto, basado en el coefi-
ciente de extinción molar de 4600 para estas sus-
tancias. (Hislop, Keon y Fielding, 1979).

Endopectatoliase. (E.C. 4.2.2.2.)

Poli-(1,4) α -galacturónico liase. Hidroliza enla-
ces α -D-(1,4) de las cadenas glicosílicas de D-galacturóni-
dos por mecanismos de β -eliminación.

Sustrato: Galacturonato sódico, a concentración final de 1 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5.

Procedimiento: Se incubó 0,5 ml de líquido de cultivo con 4,5 ml de sustrato a 37°C, durante un tiempo determinado, llevando simultaneamente blancos de líquido de cultivo y de sustrato.

La actividad enzimática se determinó midiendo el decrecimiento de la viscosidad a 30°C, en un viscosímetro capilar (Cannon-Fenske, serie 50). La viscosidad se mide antes y después de que se produzca la reacción.

Una unidad de actividad enzimática se define, como la cantidad de enzima que cataliza un decrecimiento en la viscosidad de un 1%. (Keen y Horton, 1966).

Pectinesterasa.- (E.C. 3.1.1.11.)

Pectin pectil hidrolasa. Hidroliza los grupos polimetilesteres de los D-galacturónidos.

Metodo de Willetts, Byrde y Fielding, 1977.

Sustrato: Pectina de manzana al 0,5% en ClNa 0,1 M, ajustado a un pH final de 5,5 con NaOH 0,01 N.

La NaOH utilizada, se valoró con Ptalato ácido - de potasio, resultando tener un factor de 1,05.

Procedimiento: Se incubó 1 ml de líquido de cultivo con 9 ml. de sustrato a 37°C, durante un tiempo determinado, llevando simultaneamente blancos de líquido de cultivo y de sustrato.

La actividad enzimática, se determina midiendo la adición de NaOH 0,01 N necesaria para mantener el pH de la reacción a 5,5.

Una unidad de actividad pectinesterásica se define, como la cantidad de enzima, que bajo las condiciones de ensayo, requiere la adición de 1 μ equivalente de NaOH en una hora, para mantener la reacción a un pH de 5,5 unidades. (Olutiola y Akintunde, 1979).

Xilanasa.- (E.C. 3.2.1.32.)

(1,3)- β -xilano-3-xilano hidrolasa. Hidroliza enlaces (1,3)- β de xilanos.

La actividad de esta enzima se valora por la cantidad de xilosa liberada, que se determina espectrofotométricamente por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad xilanásica, se define, como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de xilosa en un minuto.

Sustrato: xilano coloidal, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,0.

Preparación de xilano coloidal.-

A 200 mg de xilano, se le añaden 2 ml. de NaOH N. Una vez disuelto el xilano, se añade agitando ClH N hasta que la mezcla es neutra. El xilano precipitado, se centrifuga y se lava con agua destilada fría hasta que desaparecen todos los iones. Posteriormente, se centrifuga de nuevo y se recoge el precipitado. Esta masa de xilano coloidal se guarda en nevera a 4°C para preparar una suspensión en el momento de usarla.

Curva de peso seco.-

Se utiliza para determinar la cantidad de xilano. Se prepara una suspensión de xilano coloidal en agua destilada. Se cogen 0,5 ml y 1 ml y se ponen en dos pesasustancias previamente tarados; se colocan en estufa a 70°C durante 24 horas; a continuación, se pasan a un desecador - hasta alcanzar peso constante y se vuelven a pesar. La diferencia de peso, nos da los microgramos de xilano por ml. de suspensión.

De esta suspensión, se toman distintos volúmenes y se llevan a 3 ml con agua destilada, leyéndose en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. La curva se representa gráficamente, llevando en abscisas los microgramos de xilano y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig. 6)

| <u>Volumen (ml)</u> | <u>Concentración (µg.)</u> | <u>Lectura (U.A.)</u> |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|
| 0,15 | 1,20 | 0,04 |
| 0,20 | 1,60 | 0,06 |
| 0,25 | 2,00 | 0,07 |
| 0,30 | 2,40 | 0,09 |
| 0,40 | 3,20 | 0,10 |
| 0,50 | 4,00 | 0,12 |
| 0,60 | 4,80 | 0,15 |
| 0,70 | 5,60 | 0,17 |
| 0,80 | 6,40 | 0,20 |
| 0,90 | 7,20 | 0,21 |
| 1,00 | 8,00 | 0,24 |

Método.-

A 0,1 ml de líquido de cultivo se le añaden 0,9 ml de la suspensión de xilano coloidal disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,0, que contiene aproximadamente 80 µg. de xilano. (Esta concentración se obtiene con ayuda de la gráfica anterior).

El líquido de cultivo más la solución de xilano, - se incuban a 37°C durante un tiempo determinado.

Procedimiento: La cantidad de xilosa liberada, se mide por el método de Somogyi y Nelson.

Curva de peso seco de xilano

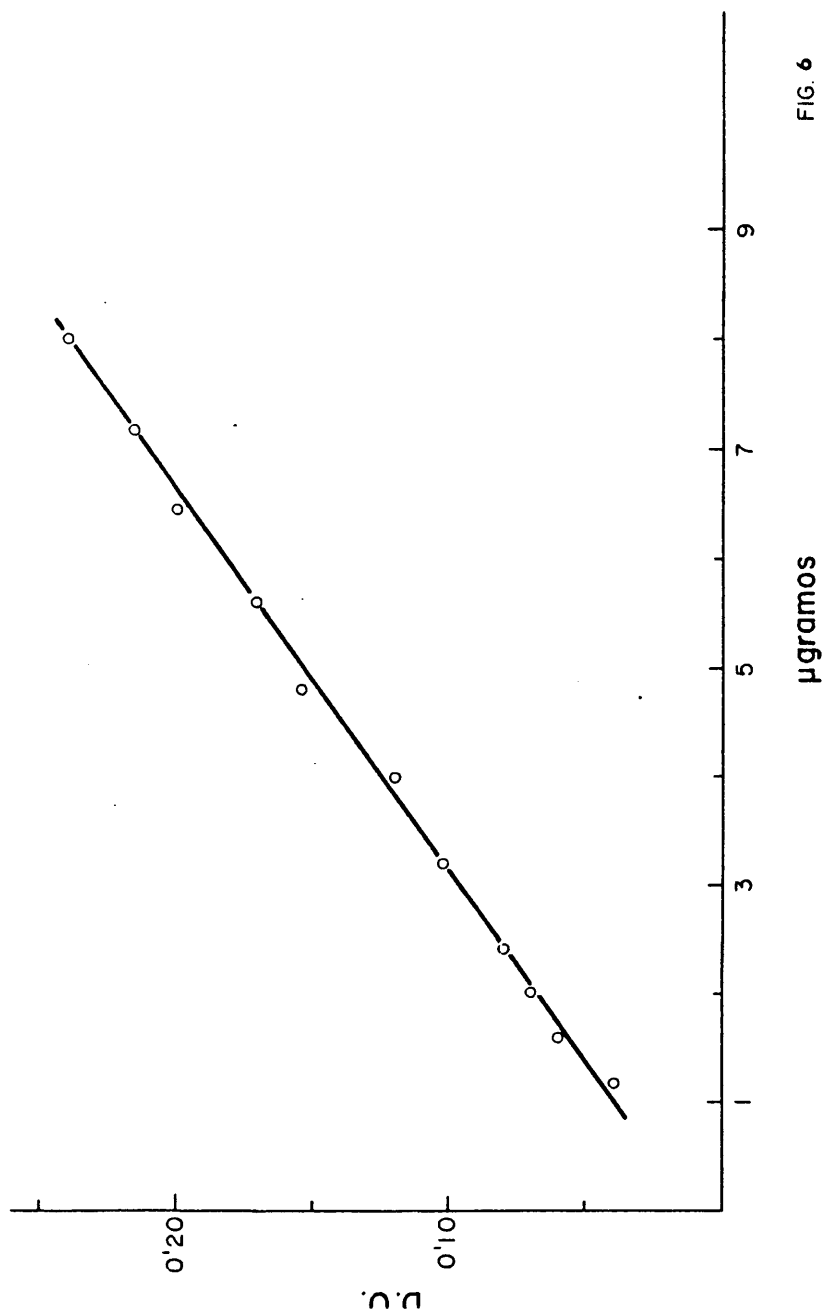


FIG. 6

Método para separar endopolimetilgalacturonasa y endopectinliasa.-

Procedimiento de Neukon, 1960, modificado por -
Serwood, 1966.

5 ml de la mezcla de la reacción se incuban durante 3 horas. A 1 ml de esta mezcla se le añaden 5 ml de ClH 0,5 N, más 10 ml de ácido tiobarbitúrico 0,01 M disuelto en agua destilada. Esta mezcla de reacción, se calienta al baño maría durante 1 hora. Se enfria, añadiendo el volumen evaporado y se centrifuga a 10.000 G durante 15 minutos para separar el precipitado (no siempre se forma). El espectro del sobrenadante se determina de 480 a 580 nm.

Simultaneamente a los tubos problema, se lleva un tubo control que tiene la mezcla de reacción (enzima más sustrato) a las cero horas de incubación.

Si al determinar el espectro de absorción, nos sale un pico a 510 nm, tendremos Endopolimetilgalacturonasa. Si el pico nos sale entre 547 y 550 nm corresponderá a la Endopectinliasa.

VALORACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS.-

Utilizamos el método de las placas de gelatina-agar. Lo usamos solo como método cualitativo. Se preparan placas Petri conteniendo una disolución de la siguiente composición:

Agar..... 1,8 gramos
 Gelatina..... 1,0 gramos
 Salicilanilida..... 10 miligramos
 H₂O destilada..... 100 ml.

Se calienta a baño maria 30 minutos para disolverlo y se extiende en 3 placas Petri, con una cantidad de 30 ml. - cada una. Se hacen los pocillos y en cada uno se echan 20 - del líquido problema (Solución de enzimas de 80 días en la - concentración de 1 mg/ 1 ml.). Luego se incuba en estufa a -- 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se revela - con una solución que contiene:

Cl Hg 15 gramos
 Cl H conc..... 20 ml.
 H₂O destilada hasta 100 ml.

Se pasan unos ml. de este líquido revelador por la superficie de la placa y si ha habido proteolisis aparece alrededor del pocillo un halo transparente, debido a la hidrólisis de la gelatina. Midiendo el diametro del halo y refiriéndose a una solución patrón, se puede usar como método cuantitativo.

DETERMINACION DE GLUCOSA. GLUCOSA OXIDASA.-

Reactivo de Glucosa oxidasa.- (De la Fuente y Sols, comunicación personal).

Solución 0,4 mM de Cl_2Mg en tampón fosfato pH 6,5 - 50 mM, que contiene por ml.: 0,4 μg . de Triton X-100, 100 μg . de O-dianisidina, 5,4 U de glucosa oxidasa y 3 U de peroxidasa (ambas enzimas de Boehringer, grado I).

Procedimiento.-

0,2 ml de muestra se incuban con 1 ml de reactivo - de glucosa oxidasa durante una hora a 37°C. (extinción total). La absorción fué medida a una longitud de onda de 425 nm.

Curva patrón.-

A partir de una solución patrón de glucosa 1 mM -- (18,0 mg. de glucosa Analar en 100 ml de agua destilada), se toman distintos volúmenes y se completan con agua destilada - hasta 0,2 ml., siguiendo a continuación el método indicado.

La curva patrón se representa gráficamente llevando en abscisas las distintas concentraciones de glucosa tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas al -- leer a la longitud de onda de 425 nm. (Fig.7).

Paralelamente en cada valoración, se llevan blancos de reactivo y patrón de glucosa en las mismas condiciones que el problema.

| <u>Volumen</u> (μl.) | <u>Concentración</u> (μmoles) | <u>Lectura</u> (U.A.) |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 5 | 0,005 | 0,035 |
| 10 | 0,010 | 0,080 |
| 20 | 0,020 | 0,160 |
| 25 | 0,025 | 0,210 |
| 50 | 0,050 | 0,400 |
| 75 | 0,075 | 0,570 |
| 100 | 0,100 | 0,780 |

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS.-

Método de Trevelyan y Harrison (1952).

Reactivo de Antrona.-

A 200 ml. de agua destilada se le agregan lentamente y con agitación, 500 ml. de SO_4H_2 concentrado. A continuación 0,2 gramos de antrona se disuelven en 100 ml. de esta -- mezcla.

Procedimiento.-

A 0,6 ml. de problema se le añaden 3 ml. de reactivo de antrona, agitar ligeramente y hervir durante 10 minutos, volver a agitar los tubos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de -- 660 nm. Paralelamente a cada valoración se llevan blancos de reactivo y de problema así como patrones de glucosa, en las -- mismas condiciones del problema.

Curva patrón.-

A partir de una solución patrón de glucosa 1 mM, - (18 mg. de glucosa en 100 ml. de agua destilada) la curva patrón se representa graficamente, llevando en abscisas las dis

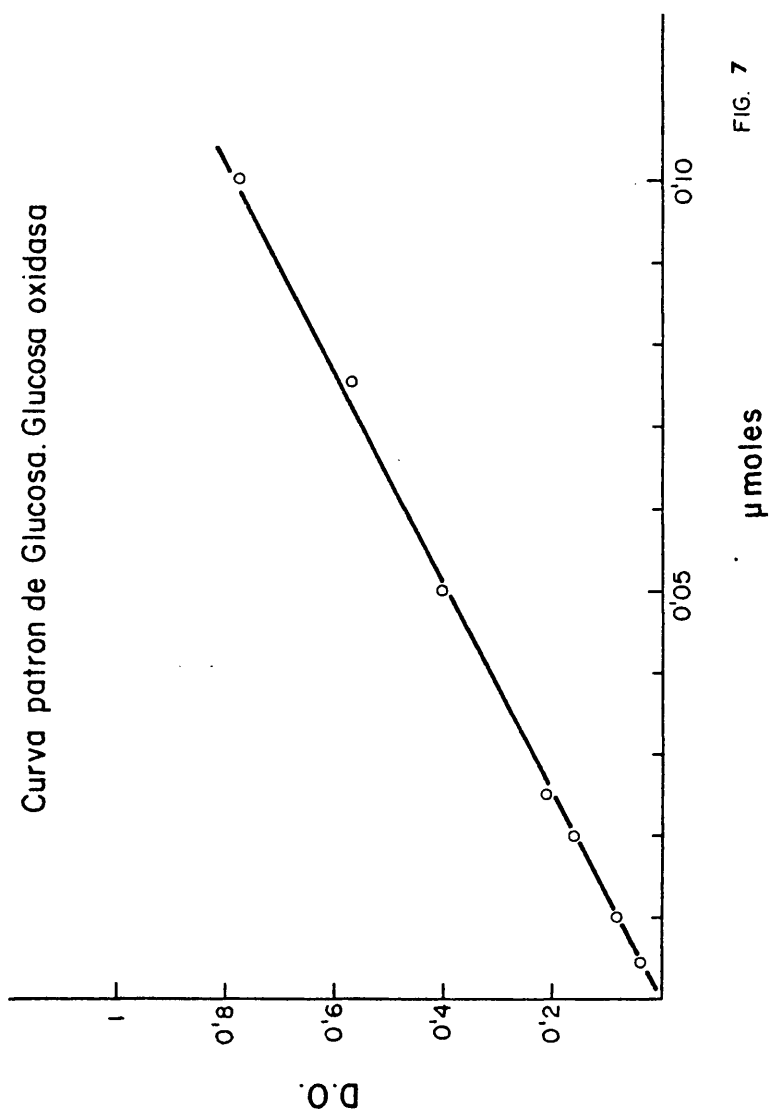


FIG. 7

tintas concentraciones de glucosa expresadas en μ moles y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig.8)

| <u>Volumen</u> (ml.) | <u>Concentración</u> (μ moles) | <u>Lectura</u> (U.A.) |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 0,05 | 0,05 | 0,060 |
| 0,10 | 0,10 | 0,115 |
| 0,15 | 0,15 | 0,190 |
| 0,20 | 0,20 | 0,220 |
| 0,25 | 0,25 | 0,270 |
| 0,30 | 0,30 | 0,300 |
| 0,35 | 0,35 | 0,340 |
| 0,40 | 0,40 | 0,390 |
| 0,45 | 0,45 | 0,440 |
| 0,50 | 0,50 | 0,460 |
| 0,60 | 0,60 | 0,560 |

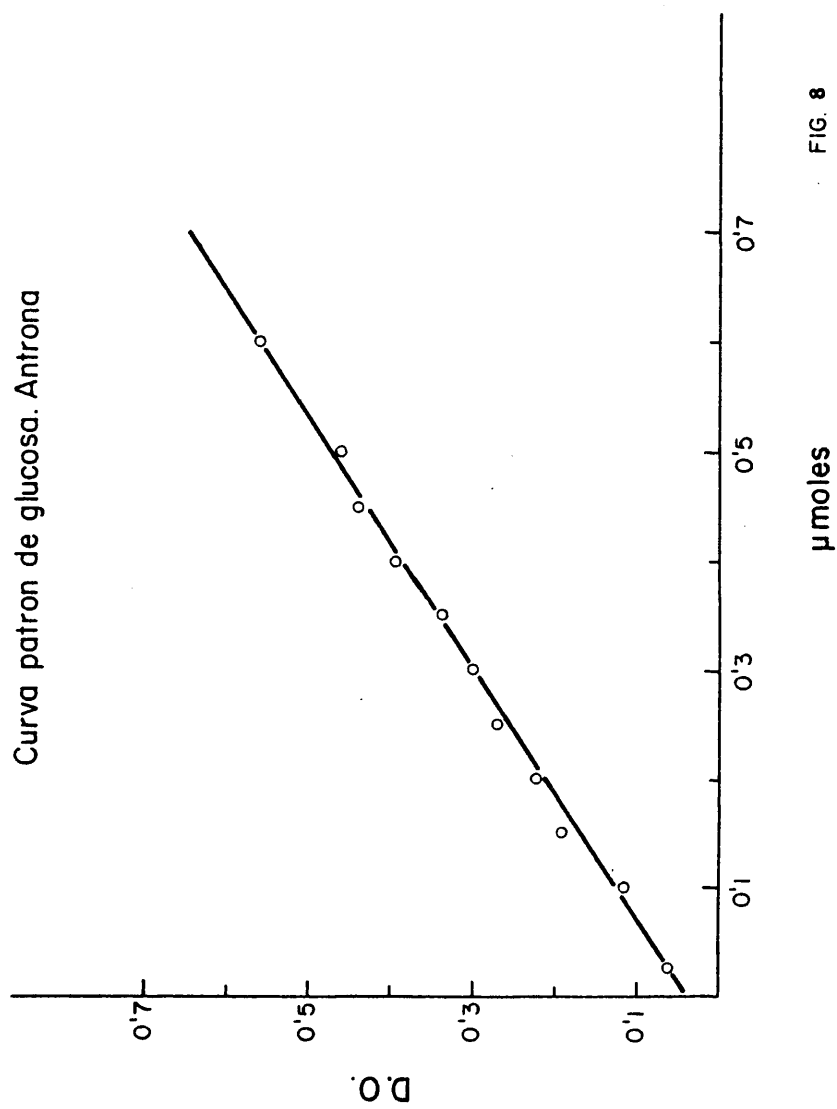


FIG. 8

OBTENCION DE EXTRACTO DE MICELIO.-

El extracto de micelio del hongo estudiado, se obtiene a partir de cultivos autolizados.

Una vez separado el micelio del líquido de cultivo por filtración a vacío, se lava varias veces con agua destilada y se pone a congelar a -20°C . El micelio congelado, se tritura en un mortero que se coloca sobre una mezcla frigorífica de hielo, alcohol y ClNa . El tiempo de trituración, varía con la edad del micelio, y se efectúa hasta que se produce la desintegración del mismo. Una vez triturado, se extrae con 6 ml de tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M. de pH 5,5. A continuación se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. Se recoge el sobrenadante, y en él, se valoran las actividades enzimáticas existentes por los métodos ya indicados.

OBTENCION DE ENZIMAS LITICAS.-

Botrytis cinerea fué crecido en cultivo estacionario a 26°C, en matraces de 1000 ml de capacidad, con 200 ml. de medio de cultivo.

Los cultivos autolizados se filtraron a través de un disco de papel de filtro (Watman nº 1), colocado en el fondo de un embudo Buchner, ejerciendo succión mediante vacío. En estos filtrados se precipitaban las proteínas existentes con ácido tánico al 1% según el método de Shibata y Nisizawa (1965), dejándose a 4°C durante dos horas. A continuación y sin variar la temperatura del precipitado se separaba por centrifugación a 6000 r.p.m. El sedimento obtenido se lavó 3 veces con acetona Merck a 4°C. y se secó por una corriente de aire filtrado. A continuación se guardó en frasco tapado y a 4°C.

VALORACION DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.-

En estos precipitados se determinaron las actividades enzimáticas existentes por los métodos ya descritos.

Un miligramo de precipitado de proteínas, se disolvía con agitación, en un ml. de tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5. A continuación esta solución se filtraba a través de un filtro Millipore esteril GS 0,22 µm., llevándose a cabo en este filtrado los análisis enzimáticos correspondientes. Estos análisis se realizaron periódicamente, para controlar la estabilidad de las enzimas a 4°C.

OBTENCION DE PAREDES CELULARES.-

Por las características especiales de Botrytis cinerea, ha sido necesario adaptar el método general de obtención de paredes para este hongo en concreto.

Basándonos en el método de Albersson (1967) de separación de partículas de diferentes propiedades superficiales en dos fases de polímeros, dextrano y polietilenglicol, se intentaron separar las esporas de las paredes por la aplicación de este método. Se comprobó que cuando las paredes se lavaban con agitación magnética rápida suspendidas en las dos soluciones de Dextrano 500 o polietilenglicol 60000 al 20% en agua, las esporas se separaban de las paredes, eliminándose posteriormente por centrifugación. De las dos soluciones de polímeros empleadas, la de mejor resultados fué la de Dextrano 500 al 20% en solución acuosa, siendo la separación mucho más rápida. Estos polímeros tienen la ventaja de que al ser biológicamente inertes, no alteran la composición de las paredes del hongo.

El procedimiento seguido fué:

- 1.- Separa el micelio del líquido de cultivo por centrifugación o filtración, y lavar varias veces con agua destilada.
- 2.- Congelar el micelio a -20°C y triturarlo congelado en un mortero que se coloca sobre una mezcla frigorífica (Hielo alcohol y ClNa). Esta operación se realiza el tiempo suficiente para que se produzca la desintegración del micelio.
- 3.- Agitación magnética de las paredes en solución de Dextrano 500 al 20% en solución acuosa, durante 12 horas.
Esta operación se efectuó para separar las esporas de las paredes del hongo.

- 4.- Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 5.- Lavar con agua destilada con agitación magnética durante 2 minutos, centrifugando a continuación durante 15 minutos a 6000 r.p.m. Esta operación se repite 5 veces, manteniéndose la temperatura a 4°C.
- 6.- Extraer con tampón acetato pH 5,5 0,05 M, a 4°C. Para esto se suspenden las hifas en este tampón, y se rompen en un desintegrador ultrasónico MSE modelo MK₂, 150 w, a 132 micrones, durante un periodo de 5 a 10 minutos, en intervalos de 1 minuto de sonicación, seguidos de 2 minutos de descanso (refrigeración del vástago). El vaso con el problema se mantiene refrigerado a 4°C.
- 7.- Lavar con agua destilada, agitación magnética y posterior centrifugación, como ya se ha explicado.
- 8.- Suspender el micelio en solución de Dextrano 500 al 20% en solución acuosa, y lavar con agitación magnética rápida y sonicando en ella durante 5 minutos en intervalos de 1 minuto. Este 2º paso en Dextrano fué necesario para separar el contenido citoplásmico de las paredes, ya que en la primera sonicación, el contenido citoplásmico queda adherido a la parte externa de las paredes.
- 9.- Lavar con agua destilada con agitación magnética y posterior centrifugación, como ya se ha indicado, para eliminar los restos de Dextrano y de contenido citoplásmico.
- 10.- Lavar en frío, a 4°C, con ClNa 0,1 M y nuevamente con agua destilada, hasta arrastrar todos los restos de ClNa.
- 11.- Observar periódicamente al microscopio, para comprobar -- cuando las paredes están limpias de todo contenido citoplasmático.

12.- Una vez limpias las paredes, se lavan con acetona fría a 4°C, por centrifugación, y se secan con una corriente de aire filtrado. Se conservan en nevera en frasco tapado, a 4°C.

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LAS PAREDES

"IN SITU".

Las paredes se suspenden en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5 (1 mg./1 ml.). A esta suspensión se le agrega 1 ml. del sustrato correspondiente para la determinación de cada una de las actividades enzimáticas. Después de parar la reacción enzimática, como se ha descrito, las paredes se separan por centrifugación, para llevar a cabo las valoraciones colorimétricas correspondientes.

CALCULO DEL GRADO DE AUTOLISIS.

El grado de autólisis alcanzado por el hongo a lo largo del periodo de incubación, se calcula por la pérdida de peso seco que experimenta el micelio a partir del peso máximo alcanzado, y se expresa en %.

Para calcular el peso seco de las muestras, el micelio se separa del líquido de cultivo mediante filtración a vacío y una vez lavado con agua destilada se seca en estufa a 80°C durante 24 horas, que es el tiempo necesario para que el peso seco del micelio sea constante.

DEGRADACION DE PAREDES CELULARES.

Método de Hughes (1971), adaptado por Reyes y Byrde (1973).

A suspensiones de paredes de diferentes edades (previamente disgregadas por sonicación durante 1 minuto) que contienen 1 mg./1 ml. en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5, se les agrega 1 ml. de la solución filtrada de enzima (1 mg/1 ml de tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5) obtenidas a partir de cultivos autolizados del propio hongo y 0,1 ml de solución de azida sódica 0,02 M (concentración final 0,5 mM). La solución así preparada se pone a incubar en tubos estériles a 37°C durante un periodo de 120 horas. Junto con los tubos problema se ponen blancos de paredes hervidas y sin hervir a incubar en las mismas condiciones.

El criterio seguido en la medida de la lisis de la pared celular fué el decrecimiento de la densidad óptica a diferentes tiempos de incubación. (Las lecturas se efectuaron a una longitud de onda de 675 nm.).

Periodicamente los hidrolizados se someten a control microscópico, para detectar cualquier contaminación.

LISIS DE LAS PAREDES CELULARES.

Este proceso se llevó a cabo por el método anteriormente descrito.

Despues de 120 horas de incubación, los hidrolizados fueron analizados para determinar los azúcares, aminoazúcares y oligosacáridos solubilizados de la pared.

71.

Las determinaciones llevadas a cabo fueron las siguientes:

- Sustancias reductoras

Método de Somogyi y Nelson.

- Glucosa

Método de glucosa oxidasa.

- N-acetilglucosamina

Método de Tracey.

- Polisacáridos totales

Método de la antrona.

DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS CINETICAS DE LOS ENZIMAS

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad enzimática, la variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima, y por el método gráfico de Lineweaver-Burk, la K_m y la velocidad máxima.

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Cantidades determinadas de líquido de cultivo y de sustrato disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M en una escala de valores de pH comprendidos entre 2,5 y 9, variando estos pH de 0,5 en 0,5 unidades, se incubaron a 37°C durante un tiempo determinado para cada problema. Paralelamente se llevaban los controles de sustrato y de líquido de cultivo correspondientes a cada muestra.

Representando graficamente en abscisas los diferentes valores de pH y en ordenadas las actividades específicas obtenidas, se observa claramente el pH óptimo de actuación de cada enzima.

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Se determinó tomando diferentes concentraciones del enzima (de 50 a 600 μ l de muestra) e incubando con una determinada cantidad de sustrato disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M, al pH óptimo de cada enzima.

La representación gráfica llevando en abscisas la concentración enzimática y en ordenadas las actividades específicas, nos da la proporcionalidad entre estas dos variables y el límite en algunos casos de esta proporcionalidad.

Determinación de la K_m (constante de Michaelis-Menten) y la -
velocidad máxima (V_m).-

Método gráfico de Lineweaver-Burk.

Diferentes concentraciones de sustrato, disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M, al pH óptimo de cada enzima, se incubaron con una determinada concentración de enzima (1 mg/1 ml.).

Representando graficamente en ordenadas, el inverso de los valores de la actividad enzimática y en abscisas el inverso de las concentraciones de sustrato, se obtiene una li-nea recta cuya intersección sobre el cuadrante negativo de la abscisa determina un valor de $- 1/K_m$.

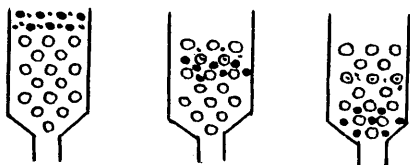
El punto de intersección de la recta con la ordenada nos da la inversa de la velocidad máxima ($1/V_m$).

FILTRACION EN GEL CON SEPHADEX.-

La filtración en gel, empieza a introducirse como - técnica de laboratorio, cuando aparece el Sephadex en 1959. - El Sephadex es un dextrano modificado. Las macromoléculas de dextrano forman una red tridimensional de cadenas de polisaca- ridos cruzadas. El Sephadex, se introdujo para la separación y fraccionamiento de moléculas según su tamaño. El Sephadex - se utiliza particularmente con sustancias de origen biológico las cuales, a menudo son muy lábiles.

Por su alto contenido en grupos hidroxilicos, el Se phadex es fuertemente hidrofílico, y los granos de Sephadex, se hinchan considerablemente en agua y soluciones electrolíti- cas.

Un proceso de filtración en gel puede describirse: Las moléculas más grandes que los poros hinchados de los gra- nos de Sephadex, no pueden penetrar en las particulas del gel y pasan a traves de la resina arrastradas por la fase líquida. Estas moléculas son las primeras que eluyen. Las moléculas - más pequeñas, sin embargo, penetran en las particulas del gel de acuerdo con su tamaño; de esta forma las moléculas eluyen de acuerdo con su tamaño y peso molecular. De acuerdo con es- te proceso, primero saldrán las moléculas de mayor tamaño, y a medida que son arrastradas por la fase líquida saldrán las de tamaño menor.



Cuando todas las moléculas han sido eluidas, la columna de Sephadex queda preparada para otro experimento. La regeneración automática, es una de las ventajas de la filtración en gel: la misma columna, puede ser usada, generalmente, para un gran número de experimentos.

Procedimiento.-

Muestras de 1 mg/1 ml, se introdujeron en una columna (Pharmacia K 26/40 y K 26/100) de Sephadex G 100, previamente equilibrada con tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5. La velocidad de elución de 4 ml/hora. Las fracciones recogidas eran aproximadamente de 2 ml. La columna fué equilibrada previamente con Dextran blue cuyo Pm es 2000000.

El contenido de proteínas de cada fracción fué determinado automáticamente en un espectrofotómetro con registro incorporado al colector de fracciones. (Isco 328; U.A.5)

Posteriormente, se determinaron las actividades enzimáticas existentes por los métodos ya descritos.

CROMATOGRAFIAS

Para caracterizar sustancias, existe un método que en la práctica resulta muy sencillo, y que consiste en comparar el camino recorrido por las sustancias problema y el recorrido por las sustancias conocidas (patrones).

En nuestro caso, hemos utilizado este método, extrayendo antes de aplicar el problema, ^{de} las sales con piridina, los carbohidratos.

Disolvente utilizado.-

El disolvente utilizado fué n-butanol, ácido acético glacial y agua, en las proporciones 400:100:220 v/v, recomendado por Block, 1958. El papel utilizado fué Whatman nº 1.

Técnica.-

Se sigue la técnica cromatográfica descendente; para obtener una buena separación seguimos el método de múltiple desarrollo (Jeanes, 1951): introducimos el cromatograma en la cámara y a las 48 horas se saca.

Revelado.-

El revelado se hizo según el método de Trevelyan (1950), impregnando el cromatograma en solución de NO_3Ag - (0,1 ml de solución saturada de NO_3Ag en 20 ml de acetona y a continuación unas gotas de agua destilada hasta que desaparece el precipitado formado). A continuación se pulveriza el cromatograma con una solución 0,5 N de NaOH en etanol de 96%. Para evitar el envejecimiento del cromatograma con el tiempo, se fijan las manchas, siguiendo la técnica de Whistler y Wolfron (1962), introduciendo este en un baño de NH_4OH 6N (3 ca agua y 1 de NH_4OH), lavar con agua abundante y dejar secar.

EXPERIMENTOS EN PLANTAS DE JUDIA .-Germinación de semillas.-

Las semillas de judia (Phaseolus vulgaris) esterilizan introduciéndolas en una solución que contiene:

Cl Hg 2 gramos

Cl H 7 ml.

H₂O destilada.. 1 litro

En esta solución, se agitan las judías suavemente durante 10 minutos. Luego, las semillas se lavan 3 o 4 veces con agua - destilada esteril.

Una vez esterilizadas las semillas, se vierten en - una placa Petri grande con filtro y esterilizada previamente. El filtro se mantiene humedecido constantemente mediante la - adición de pequeñas cantidades de agua destilada esteril. La placa así preparada, se incuba en estufa a 28°C durante 5 --- días, y de esta forma y con la humedad se produce la germinación de las semillas.

Crecimiento de las plantas.-

Las semillas germinadas, se colocan en macetas con arena lavada con ClH 1 N durante 24 horas y neutralizada posteriormente mediante lavados con agua.

El riego de las macetas, se lleva a cabo cada 2 días con 50 ml. de una solución nutritiva que contiene:

NO₃K 0,505 gramos/litro

(NO₃)₂Ca 0,820 gramos/litro

PO₄H₂Na.2H₂O 0,208 gramos/litro

$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,370 gramos/litro
 citrato férrico 0,024 gramos/litro
 suplementada con elementos traza (una gota por litro de la so-
 lución): $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3,5 gramos/litro
 $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1 gramos/litro
 $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,234 gramos/litro
 BO_3H_3 500 mg/litro
 $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 300 mg/litro

Al cabo de 15 días, las plantas de judía han crecido, dando 2 o 3 hojas, y pueden ya inocularse.

Inoculación.-

Solución de enzimas de 80 días a una concentración de 10 mg/1 ml. se coloca mediante una escisión en el tallo de las plantas problemas, y en las hojas se coloca despues de -- raspar ligeramente su superficie con cuidado de no romper su estructura.

Las plantas control tienen las mismas heridas, tanto en el tallo, como en las hojas, pero no están inoculadas con la solución de enzimas.

La solución de enzimas se hace en tampón citrato-fosfato-borato de pH 5,5 0,05 M. La cantidad de solución de enzi-
 ma depositada en el tallo es de 50 μl y en las hojas de 20 μl .

MACERACION DE TEJIDOS.-

Método de Ishii, 1976.

Los tejidos vegetales utilizados fueron: patata, - manzana y zanahoria.

1,2 gramos de tejido* (aproximadamente 8 cuadritos de 150 mg cada uno) se colocan en matraces de 100 ml de capacidad con 14,4 ml de tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,5 unos, y otros con 14,4 ml de agua destilada. (Todos estos matraces con el medio se esterilizan). A cada matraz, se le añaden 2 ml de solución de enzima (la solución contiene 1 mg/ml). Simultáneamente se llevan blancos de tampón y de - agua.

Los matraces se agitan a 160 r.p.m. y 37°C durante 14 horas, en un agitador-incubador orbital "Gallemkamp, modelo IH, 400" (Inglaterra).

Al cabo de este tiempo, la reacción se para filtrando el contenido de los matraces a través de un filtro de 24 mesh, que deja pasar solo células simples.

Valoraciones llevadas a cabo en el filtrado:

- Volumen de células sedimentadas.
- Valoración de ácido galacturónico (Método del - carbazol).
- Conductividad.
- Sustancias reductoras (Método de Somogyi y Nelson).

* El tejido se lava previamente con una solución de azida - 0,01 M.

Metodo del Carbazol

Este método se utiliza para valorar ácido galacturónico.

A 1 ml de la solución problema, que puede contener de 5 a 100 μg de ácidos urónicos por ml, se le añaden 6 ml de ácido sulfúrico concentrado, enfriando a la vez. Esta mezcla se calienta al baño maria hirviendo durante 20 minutos; Posteriormente se enfria hasta temperatura ambiente y se le añaden 0,2 ml de solución de carbazol al 0,1% en etanol. La mezcla se agita con cuidado y se deja de 10 minutos a 1 hora como máximo a temperatura ambiente, para que se desarrolle un color rosaceo que se lee en el espectrofotómetro a 530 nm.

Simultaneamente a los tubos problemas, se llevan blancos de agua y de tampón.

(Dische colorimetric carbazole methods. Kabat and Mayer's. 2ª edición. 1964)

Conductividad

La conductividad se mide en un conductímetro "Philips, modelo PW 9504/00", previamente ajustado con una solución de ClK 0,1 N.

Los valores obtenidos en resistividad se pasan a conductividad, y se multiplican por la inversa del factor constante que corresponde a la célula del conductímetro:

$$C = \frac{1}{R} \cdot \frac{1}{f} = \mu\text{mhos/cm}$$

$$f = 1,46.$$

Estudios de células muertas.-

Las células procedentes de los tejidos vegetales se sumergen en una solución que contiene:

NO_3K 0,6 M

Cl_2Ca 1 mM

Tampón fosfato de pH 7,5 20 mM

Rojo neutro 0,01%

Después de 20 minutos, se quita esta solución (1 ml) y se lavan las células con solución de NO_3K 0,6 M (3 ml) varias veces. Las células muertas se pueden visualizar debido a que han perdido su capacidad de acumular el rojo neutro, por lo que se visualizan sin teñir. (Bashman y Bateman, 1975)

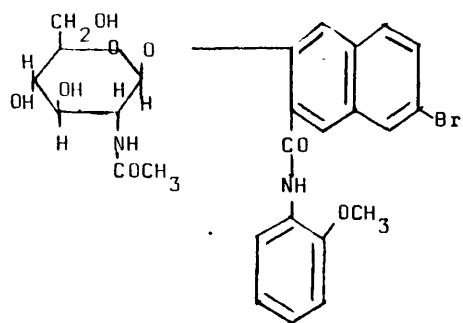
HISTOQUIMICA

Localización histoquímica de la β -N-Acetilglucosaminidasa al microscopio óptico.-

Basándonos en el método de Hayashi (1965), el procedimiento seguido fué:

- 1.- Fijación del tejido: Después de probar varios métodos de fijación, pudimos comprobar que los métodos más adecuados eran la fijación con formalina neutra (Formalin 10%) durante 20 horas o la fijación con glutaraldehído al 5% durante 5 horas. Lavar después con agua destilada.
- 2.- El tejido no se deshidrata en etanol durante 5 minutos, porque se produce inactivación del enzima.
- 3.- Incubación del micelio con el sustrato durante 30 minutos a 37°C.
Sustrato: 1 mg de Naftol ASBI N-acetil- β -glucosamida, - (llamado también Naftol ASBI 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido) más 0,16 ml de metilcellosolve (ó etilen glicol monometiléter) más 5,3 ml de tampón citrato 0,1 M de pH 5,2. A esta solución se le agregan 5,3 mg de Fast Garnet.
- 4.- Colocar el micelio sobre un porta y ponerle una gota de montador acuoso. Colocar el cubre y mirar al microscopio.

5.- Inhibición del enzima: se consigue una inhibición completa del enzima, previa incubación del micelio durante 1 hora a 37°C, con N-acetilglucosaminolactona a concentración de 5 mM. (Este tratamiento se efectua antes de la incubación con el sustrato.



Naftol ASBI N-acetil-glucosamida . Pm = 590,9.

Fórmula empírica: $C_{26}H_{27}BrN_2O_9$.

Localización de la β -N-acetilglucosaminidasa al microscopio electrónico.-

Basándonos en el método de Daniel C. Pease (1964) y en el de John y Luft (1961), el procedimiento seguido fué:

- 1.- Fijación del tejido: el micelio se sumerge en una solución de glutaraldehído al 5% en tampón Palade, durante 5 horas.
- 2.- Lavar en tampón fosfato pH 7,3 o 7,4 hasta que desaparezca el fijador.
- 3.- No deshidratar en etanol, durante 5 minutos, porque se produce inactivación del enzima.
- 4.- Incubación con el sustrato a 37°C durante una hora.
Sustrato: 1,3 mg de Naftol ASBI acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido, más 0,5 ml de etilen-glicol monometil-eter, más 9,5 ml de tampón citrato 0,1 M de pH 5,2. Tomar de la mezcla 1,6 ml y llevar a 5 ml con el mismo tampón. Esta solución tiene una concentración final de 0,08 mM.
- 5.- Inhibición del enzima: se consigue la inhibición del enzima si previamente a la incubación con el sustrato, el micelio se incuba con el inhibidor (N-acetilglucosaminolactona a una concentración de 5 mM) durante 1 hora.
- 6.- Lavar con tampón fosfato 1/15 M de pH 7,4 a temperatura ambiente. Esta operación se repite 3 veces.
- 7.- Acoplamiento con p-acetoxymurcuric anilina al 4% (AMA) - durante 3 minutos a temperatura ambiente. Es un reactivo para visualizar el Naftol ASBI producto de la hidrólisis enzimática.

- a) ácido acético glacial al 50%, 5 ml.
p-acetoxymercurio anilina, 200 mg.
Enfriar esta mezcla a 4°C, durante 45 minutos.
- b) 0,4 gr. de nitrito sódico en 10 ml. de agua destilada a 4°C.
- c) 5 ml. de a) más 5 ml. de b), incubar durante 15 minutos a 4°C y filtrar.
- d) 0,1 ml. del filtrado, más 7 ml. de tampón fosfato 1/15 M de pH 7,6, se prepara a temperatura ambiente, cuando se va a utilizar, y en esta solución se ~~sumerge~~ el micelio.

- 8.- Lavar con tampón fosfato 1/15 M de pH 7,4 a temperatura ambiente (Repetir esta operación 3 o 4 veces).
- 9.- Incubar 30 minutos con Tiocarbhidracida al 1% (TCH) en tampón fosfato 1/15 M de pH 7,4. Para disolver esto, es necesario calentar a 35°C durante 15 minutos. Luego se enfria a 25°C, y en esta solución se introduce el micelio.
- 10.- Lavar mucho el micelio (unas 10 veces) con tampón fosfato 1/15 M de pH 7,4, para evitar que el TCH reaccione con el osmio dando un precipitado negro.
- 11.- Incubar en tetróxido de osmio en solución acuosa al 1,5 %. Ajustar el pH con NaOH a 7,4. Incubar toda la noche a 4°C.
- 12.- Lavar en frío con tampón fosfato 1/15 M de pH 7,4, 3 o 4 veces, y dejar en tampón durante 2 horas a 4°C.
- 13.- Deshidratación en alcohol a temperatura ambiente:
 - Alcohol 20% 10 minutos
 - " 30% 10 minutos
 - " 50% 10 minutos

Alcohol 70% más acetato

de uranilo 2% toda la noche

" absoluto 3 cambios de 1 h. cada uno

" absoluto 1 cambio de 30 minutos

oxido de propileno 1 cambio de 20 minutos

13.- Inclusión en Epon 812 (Según método de John y Luft en 1961):

Solución A: Epón 812, 62 ml.

Dodecenyl succinic anhidride, 100 ml.

Agitar esta mezcla durante media hora.

Solución B: Epon 812, 100 ml.

Nadic metyl A, 89 ml.

Agitar esta mezcla durante media hora.

El procedimiento seguido fué:

- Dejar la muestra en solución A , más solución B, más oxido de propileno, de 2 a 4 horas.

2 ml. A + 4 ml. de B + 6 ml. oxido de propileno

- Dejar la muestra en solución A, más solución B toda la noche.

2 ml. A + 4 ml. B

- A la mañana siguiente, preparar 2 ml. de A, más 4 ml. de B y multiplicar por 0,018 estos ml. y añadir el total de el acelerador DMP 30 (2,4,6 tri-dimetilaminometil-fenol). Agitar 1 hora.

Una vez colocada esta mezcla con el micelio en las capsulas correspondientes:

. incubar 12 horas a 37°C.

. incubar 12 horas a 45°C.

. incubar 12 horas a 60°C.

Las capsulas se guardan a temperatura ambiente hasta que se van a cortar.

- 15.- Tallar la pieza.
- 16.- Cortar en el ultramicrotomo cortes de aproximadamente 1 - 800 Å. El ultramicrotomo es L.K.B. con cuchilla de vidrio.
- 17.- Tinción durante 15 minutos en citrato de plomo. Esta operación se hace en un cristal cubierto de parafina.
- 18.- Lavar en NaOH 0,01 M.
- 19.- Lavar en agua destilada.
- 20.- Secar en papel de filtro. Desecar.
- 21.- Mirar al microscopio electrónico.

Método según la técnica de Reynolds, E.S. (1963).

Reactivos:

- Procedimiento.-

Los cortes se tiñen en esta solución durante un tiempo que depende del tipo de inclusión utilizada. Para inclusiones con resinas epoxi, como es el epon, este tiempo oscila entre 15 y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los cortes se lavan varias veces con agua destilada, se dejan secar, y quedan preparados para mirar al microscopio electrónico.

TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA PARA PAREDES CELULARES.-Tecnica de sombreado con Au/Pd.-

Mediante la aplicación de esta técnica, se observa al microscopio electrónico la morfología externa de las paredes jóvenes, antes y después de ser sometidas a la lisis enzimática. Las paredes son lavadas tres veces con agua destilada por centrifugación a 4000 r.p.m.

Las paredes lavadas se colocan sobre rejillas con película de formvar reforzada con carbono, para lo cual estas rejillas se colocan sobre papel de filtro previamente humedecido. Para aplicar la muestra sobre la rejilla, se pone sobre esta, una gota de la suspensión de paredes con una pipeta Pasteur, con cuidado de no dañar la rejilla. La rejilla con la muestra se coloca en una placa Petri y se seca en estufa a 37°C. Una vez secas las preparaciones, se observan al microscopio óptico para comprobar la colocación de la muestra. A continuación las paredes, se somborean con Au/Pd en un vaporizador Siemens, y quedan preparadas para mirar al microscopio electrónico.

PROCEDENCIA DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS

Los reactivos empleados para todos estos experimentos, fueron de pureza analítica, procediendo de las siguientes firmas:

Probus, S.A., Badalona (España); E.Merck, Darmstadt (Alemania); Serva, Heildelber (Alemania); Difco, Detroit (U.S.A.); Riedel, De Haën A.G.-Seelze Hannover (Alemania); May and Baker LTD. Dagenham (Inglaterra); Fluka A. G. Busch SG (Suiza); Sigma, St. Louis M.O. (U.S.A.); Koch-Light, Laboratories Ltd. Colnbrook, Bucks (Inglaterra); BDH, Poole (Inglaterra).

RESULTADOS

OPERACIONES REALIZADAS EN EL LÍQUIDO DE CULTIVO Y EN EL EXTRAC- TO DE MICELIO.-

Medida del pH en el líquido de cultivo.-

Se determinaba el pH en un medidor eléctrico Beckman modelo "Zeromatic S-S-3".

Valoración de proteínas en el líquido de cultivo y en el ex- tracto de micelio.-

Se realizaba por el método de Lowry y colaboradores (1951), descrito en el epígrafe de "Materiales y Métodos".

La valoración se realizaba a partir de 0,2 ml de lí-
quido problema, leyendo la absorción en el espectrofotómetro
a una longitud de onda de 660 nm.

Llevábamos siempre un tubo con 0,2 ml de patrón co-
mo referencia. Los resultados se expresaban en mg/muestra.

Valoración de azúcares reductores en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio.-

Esta se realizaba a partir de 0,1 ml de líquido pro-
blema, siguiendo el método de Somogyi-Nelson (1944), descrito
ya en el apartado de "Materiales y Métodos. Junto con el tubo
que contenía el líquido problema se colocaba otro que conte-
nía 0,5 ml. de la solución de glucosa patrón. Los resultados
se expresaban en μ moles/muestra.

Valoración de la actividad enzimática en el líquido de culti- vo y en el extracto de micelio.-

Se realizó según los distintos métodos descritos en
el apartado de "Materiales y Métodos", cambiando el tiempo

de incubación según el grado de actividad de los enzimas estudiados.

Estos tiempos de incubación fueron:

- β -N-acetilglucosaminidasa: 15 minutos.
- Quitina: 24 horas.
- Fosfatasa ácida: 2 horas.
- Fosfatasa alcalina: 2 horas.
- (1,3)- β -glucanasa: 20 minutos.
- Invertasa: 20 minutos.
- Celulasa: 20 minutos.
- α -amilasa: 20 minutos.
- (1,6)- β -glucanasa: 20 minutos.
- (1,4)(1,3)- β -glucanasa: 20 minutos.
- Dextranasa: 20 minutos.
- Poligalacturonasa: 2 horas.
- Polimetilgalacturonasa: 2 horas
- Exopectinliasa: 5 horas.
- Endopectinliasa: 5 horas.
- Exopectatoliasa: 5 horas.
- Endopectatoliasa: 5 horas.
- Pectinesterasa: 5 horas.
- Xilanasa: 2 horas.

Curso del proceso autolítico.-

En las condiciones de cultivo ya descritas, al cuarto día de incubación, ya se observa en los cultivos de Botrytis cinerea un buen crecimiento, alcanzándose el peso máximo del micelio en el sexto día del periodo de incubación.

En la tabla siguiente se encuentran agrupados los diferentes pesos secos del micelio a lo largo del periodo de incubación, así como los grados de autólisis alcanzados por este hongo. Estos resultados son la media de tres experimentos.

| <u>Días</u> | <u>Peso seco del micelio (mg/muestra)</u> | <u>Grado de autólisis %</u> |
|-------------|-------------------------------------------|-----------------------------|
| 5 | 94,0 | -- |
| 6 | 126,6 | -- |
| 7 | 87,2 | 31,1 |
| 12 | 61,8 | 51,1 |
| 20 | 49,0 | 61,2 |
| 26 | 38,1 | 69,9 |
| 33 | 34,1 | 73,0 |
| 40 | 33,5 | 72,5 |
| 47 | 24,8 | 80,4 |
| 54 | 26,3 | 79,2 |
| 61 | 25,7 | 79,6 |
| 69 | 25,0 | 80,2 |
| 76 | 25,2 | 80,0 |

En la Fig. 9 , se encuentran representados los valores de los grados de autólisis alcanzados por el hongo (ordenadas), a medida que avanza el tiempo de incubación (abscisas), observándose que el grado de autólisis aumenta progresi

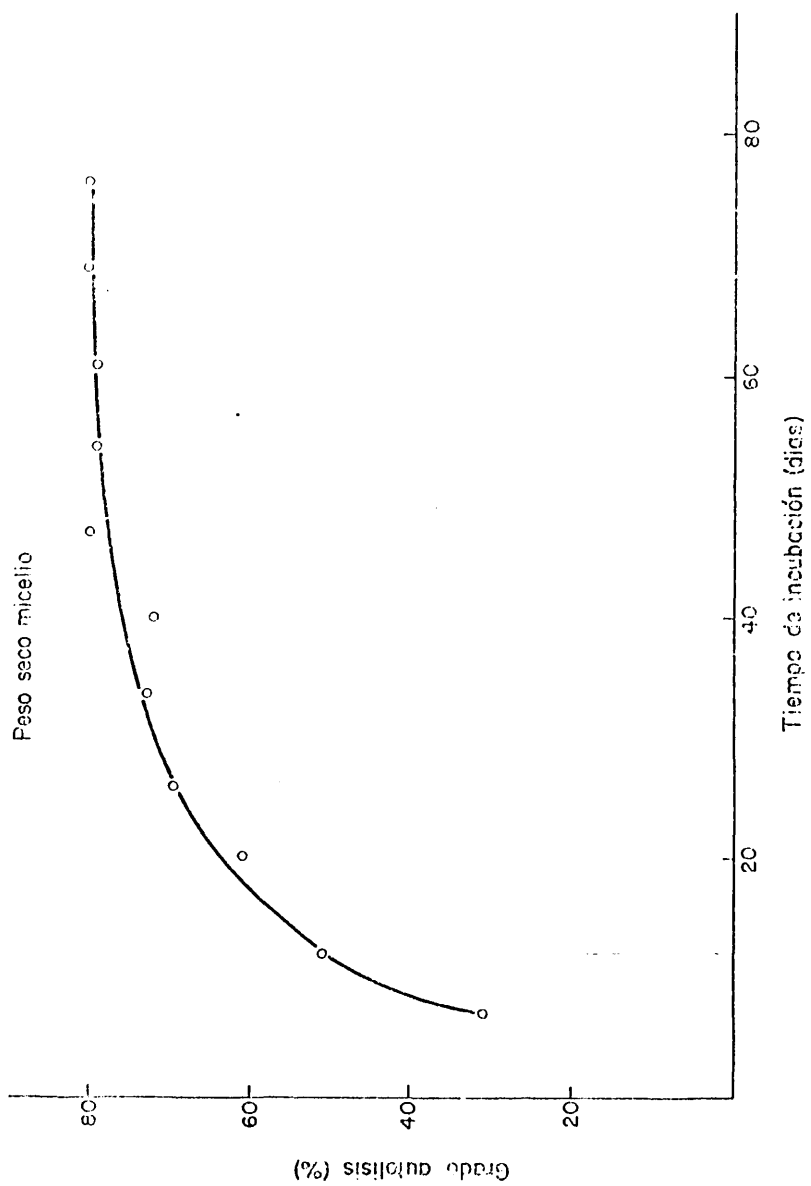


FIG 9

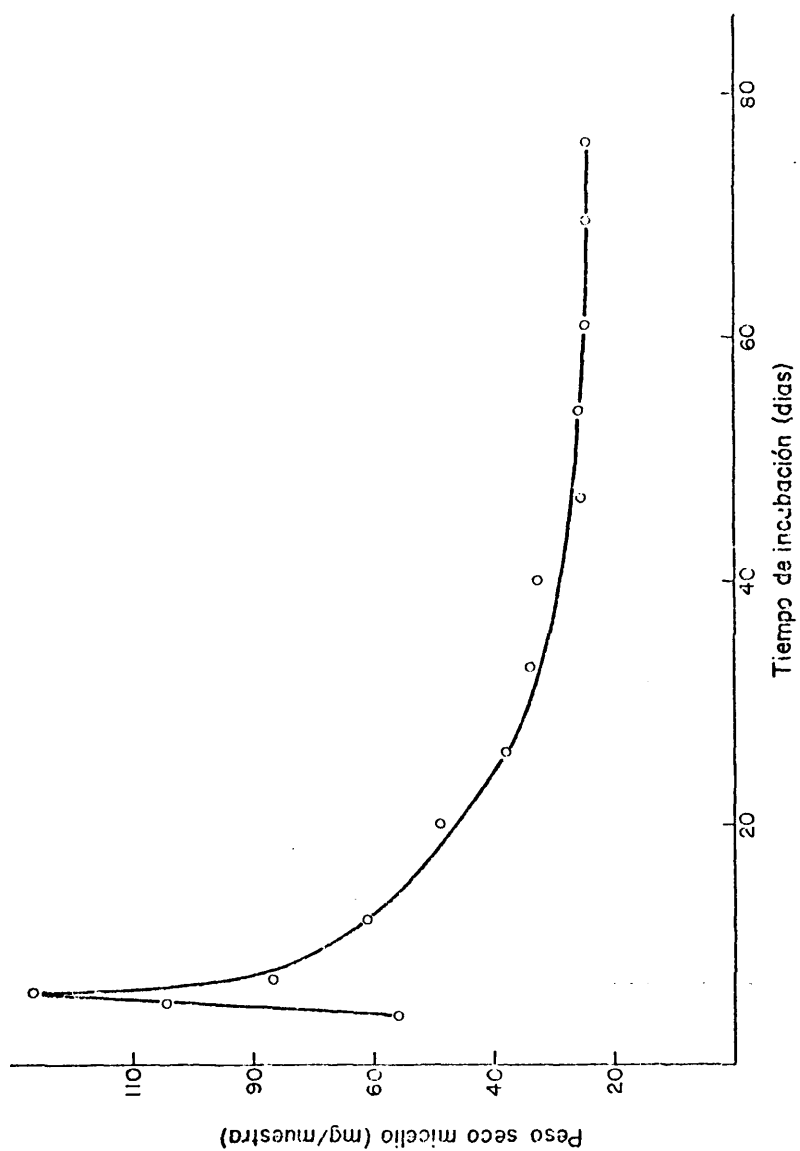


FIG 10

vamente a lo largo del periodo de incubación, alcanzándose un grado de autólisis de un 80% al final del proceso autolítico.

En la gráfica de la Fig.10 , hemos representado el curso de la autólisis de Botrytis cinerea, tomando en abscisas el tiempo de incubación expresado en días y en ordenadas el peso seco del micelio expresado en mg/muestra. En esta gráfica observamos una curva típica de un proceso de autólisis, variando el peso máximo del micelio, en los distintos experimentos realizados, entre 125 y 127 mg/muestra. A partir de este máximo, la curva se hace descendente, como es típico en estos procesos.

Variación del pH en la autólisis.-

En la siguiente tabla se encuentran agrupados los valores de pH presentados por este hongo a lo largo del periodo de incubación.

| <u>Días</u> | <u>pH</u> |
|-------------|-----------|
| 5 | 5,4 |
| 6 | 5,5 |
| 7 | 5,6 |
| 12 | 6,6 |
| 20 | 6,7 |
| 26 | 6,8 |
| 33 | 6,9 |
| 40 | 6,9 |
| 47 | 7,0 |
| 54 | 6,9 |
| 61 | 6,9 |
| 69 | 6,9 |
| 76 | 6,9 |

Observando estos valores, podemos ver que la fase de autólisis transcurre a un pH entre 6,7 y 6,9 unidades.

Estos resultados se representan en la gráfica de la Fig. 11 , llevando en abscisas el tiempo de incubación (días) y en ordenadas los valores de pH.

Determinación de Glucosa residual.-

En la tabla siguiente hemos agrupado los valores de la glucosa residual en el líquido de cultivo y en el extracto del micelio, durante el curso de la autólisis, expresado en $\mu\text{m}/\text{muestra}$.

| <u>Días de incubación</u> | <u>Glucosa residual $\mu\text{m}/\text{muestra}$</u> | |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|
| | <u>L.C.</u> | <u>Ext.M.</u> |
| 5 | 60,1 | 34,8 |
| 6 | 13,2 | 35,2 |
| 7 | 7,2 | 21,6 |
| 12 | 3,8 | 20,2 |
| 20 | 3,6 | 9,5 |
| 26 | 2,8 | 4,4 |
| 33 | 2,2 | 3,9 |
| 40 | 1,8 | 2,7 |
| 47 | 1,8 | 0,0 |
| 54 | 1,6 | 0,0 |
| 61 | 1,2 | 0,0 |
| 69 | 0,0 | 0,0 |
| 76 | 0,0 | 0,0 |

A partir de los resultados obtenidos en el líquido de cultivo, se observa que la desaparición de la cantidad inicial de glucosa, coincide con la aparición de la autólisis.

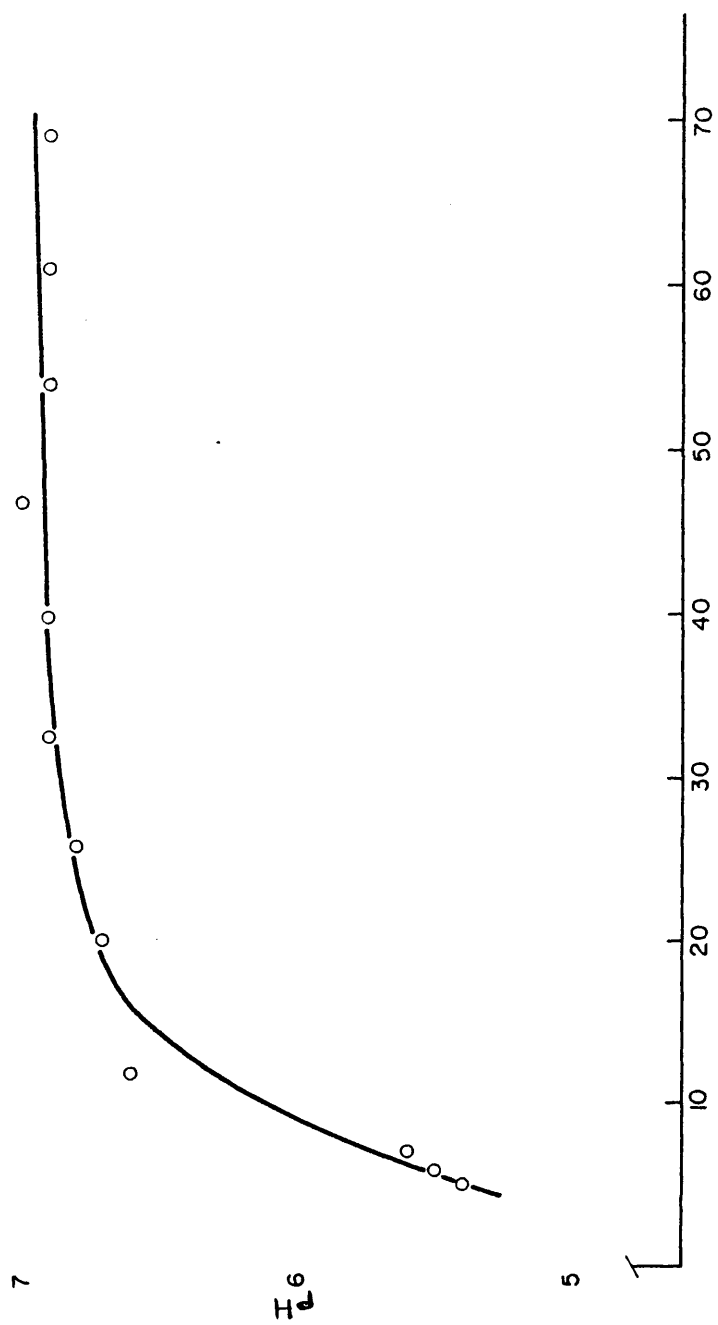


FIG.11
Tiempo de incubación (días)

100.

sis, comprobándose que esta tiene lugar cuando empiezan a fallar los nutrientes del medio.

Determinación de proteínas.-

En la tabla siguiente se encuentra la variación de proteínas en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio, durante el curso de la autólisis, expresada en mg/muestra.

| <u>Días de incubación</u> | <u>Proteínas</u> | |
|---------------------------|------------------|---------------|
| | <u>L.C.</u> | <u>Ext.M.</u> |
| 5 | 5,8 | 6,76 |
| 6 | 7,0 | 7,84 |
| 7 | 8,8 | 6,84 |
| 12 | 8,9 | 7,80 |
| 20 | 11,1 | 3,55 |
| 26 | 10,9 | 1,98 |
| 33 | 10,6 | 1,52 |
| 40 | 10,5 | 1,36 |
| 47 | 10,0 | 1,24 |
| 54 | 10,6 | 0,92 |
| 61 | 10,5 | 0,87 |
| 69 | 10,5 | 0,88 |
| 76 | 9,0 | 0,87 |

Se puede observar que los valores correspondientes al líquido de cultivo van aumentando progresivamente hasta hacerse prácticamente constantes.

En el extracto de micelio, los valores obtenidos reflejan un aumento en la concentración de proteínas hacia la mitad del proceso, para luego descender hasta hacerse constante.

ESTUDIOS CINÉTICOS DE LAS ENZIMAS APARECIDAS EN LA AUTOLISIS
DEL HONGO BUTRYTIS CINEREA.-

Los estudios cinéticos se llevaron a cabo en la solución de enzimas obtenidos de los precipitados proteínicos del líquido de cultivo.

β -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido, a concentración final 2,2 mM, en tampón citrato fosfato-bprato 0,05 mM de diferentes valores de pH.

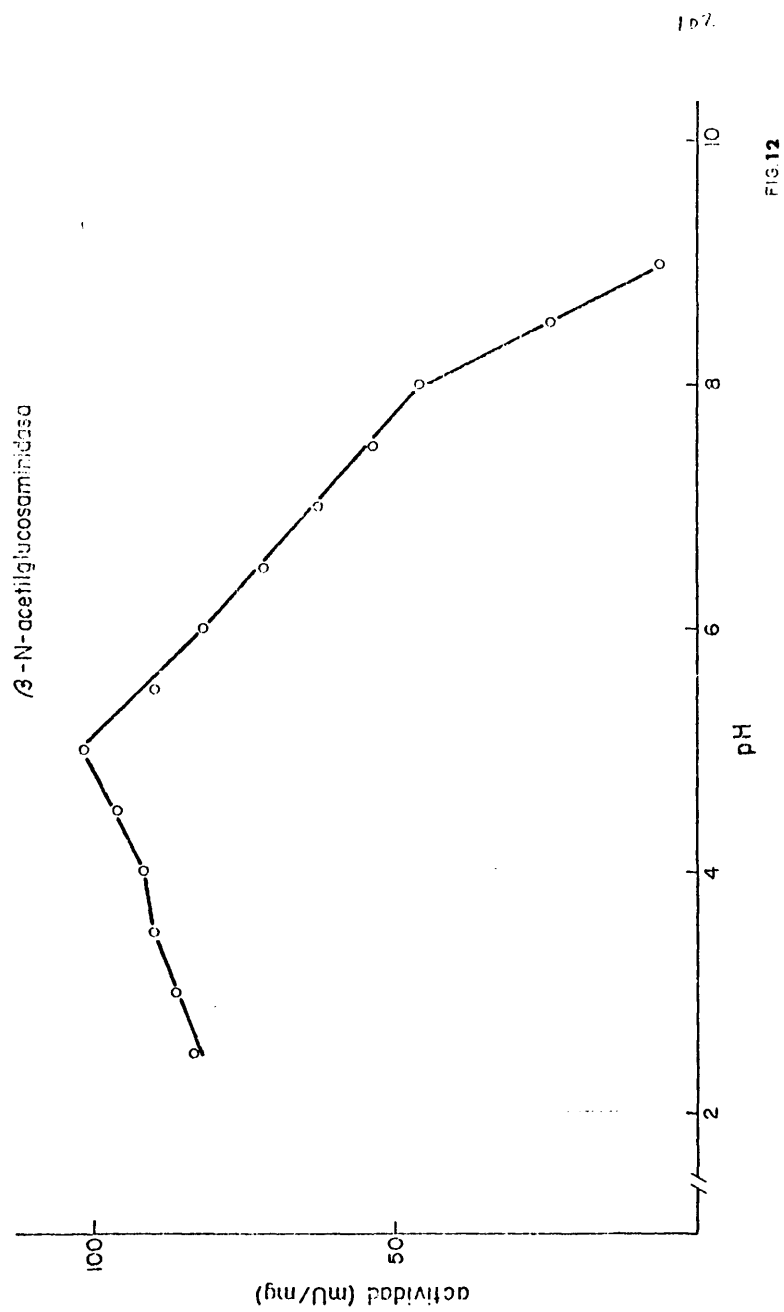
Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

Proteínas: 0,780 mg/ ml de la solución de enzimas.

Tiempo de incubación: 10 minutos.

Los valores obtenidos fueron:

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 2,5 | 0,42 | 84 |
| 3,0 | 0,43 | 87 |
| 3,5 | 0,45 | 90 |
| 4,0 | 0,46 | 92 |
| 4,5 | 0,48 | 96 |
| 5,0 | 0,51 | 102 |
| 5,5 | 0,45 | 90 |
| 6,0 | 0,41 | 82 |
| 6,5 | 0,36 | 76 |
| 7,0 | 0,32 | 64 |
| 7,5 | 0,27 | 54 |



| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 8,0 | 0,23 | 46 |
| 8,5 | 0,12 | 24 |
| 9,0 | 0,03 | 6 |

El pH óptimo obtenido fué de 5 unidades. Los resultados se encuentran representados en la gráfica de la Fig. 12 tomando en abscisas los valores de pH y en ordenadas las actividades específicas obtenidas.

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido, a concentración final de 2,2 mM en tampón de citrato-fosfato-borato de pH 5,0 , 0,05 M.

Volumen de solución de enzima: de 5 a 60 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml. de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 15 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

| Volumen de solución de enzima (μ l.) | Lectura U.A. | Act. específica (mU/mg) |
|----------------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| 5 | 0,48 | 16,92 |
| 10 | 0,51 | 17,98 |
| 15 | 0,52 | 18,33 |
| 20 | 0,53 | 18,68 |
| 25 | 0,54 | 19,04 |
| 30 | 0,55 | 19,39 |
| 35 | 0,56 | 19,74 |

104.

| <u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Act. específica (mU/mg)</u> |
|------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 40 | 0,57 | 20,09 |
| 45 | 0,58 | 20,44 |
| 50 | 0,59 | 20,80 |
| 55 | 0,61 | 21,50 |
| 60 | 0,62 | 21,86 |

Los resultados obtenidos se representaron en la gráfica de la Fig.13 .

De esta gráfica podemos deducir, que a medida que -
aumenta la concentración de enzima, aumenta la actividad enzimática.

Determinación de la $V_{m\acute{a}x}$.(velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido, a concentraciones finales desde 0,029 a 5,84 mM en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5,0.

Volumen de solución de enzima: 240 μ l.

Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 15 minutos.

Los resultados obtenidos fueron:

β -N-acetilglucosaminidasa

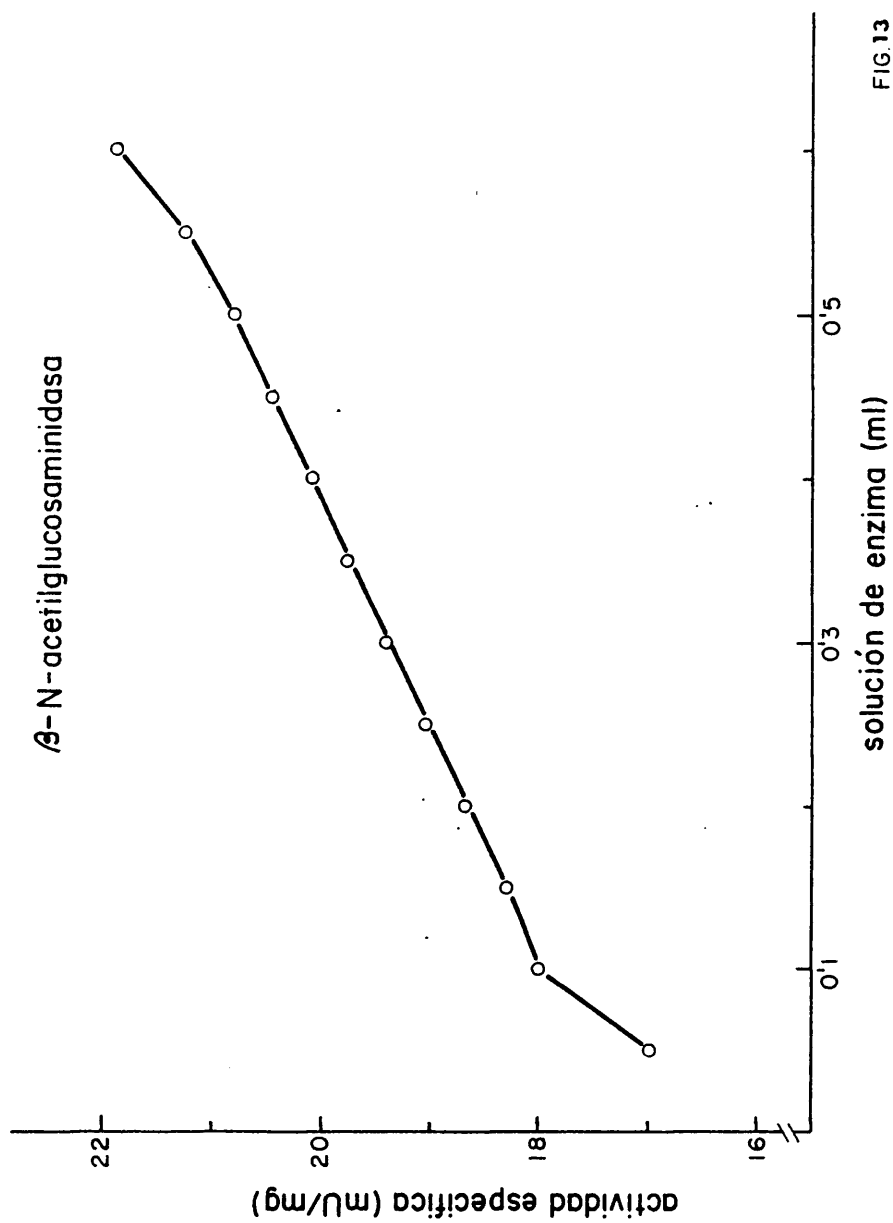


FIG. 13

| Concentración de sustrato (mM) | $1/[S]$ mM ⁻¹ | Lectura U.A. | Actividad mU/ml. | $(1/V)10^3$ $1/U/ml$ |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|
| 0,029 | 34,40 | 0,14 | 18,6 | 53,7 |
| 0,058 | 17,20 | 0,32 | 42,6 | 23,4 |
| 0,087 | 11,40 | 0,40 | 53,3 | 18,7 |
| 0,110 | 9,10 | 0,52 | 69,3 | 14,4 |
| 0,140 | 7,14 | 0,65 | 86,6 | 11,5 |
| 0,170 | 5,88 | 0,78 | 104,0 | 9,6 |
| 0,200 | 5,00 | 0,91 | 121,3 | 8,2 |
| 0,230 | 4,34 | 1,03 | 137,3 | 7,2 |
| 0,260 | 3,84 | 1,15 | 153,3 | 6,5 |
| 0,290 | 3,44 | 1,20 | 160,0 | 6,2 |
| 0,580 | 1,72 | 1,12 | 149,3 | 6,7 |
| 0,870 | 1,14 | 0,96 | 128,0 | 7,8 |
| 1,160 | 0,86 | 0,80 | 106,6 | 9,3 |
| 1,460 | 0,68 | 0,73 | 97,3 | 10,2 |
| 1,750 | 0,57 | 0,59 | 78,6 | 12,7 |
| 2,040 | 0,49 | 0,49 | 65,3 | 15,3 |
| 2,330 | 0,43 | 0,48 | 64,0 | 15,6 |
| 2,630 | 0,38 | 0,45 | 60,0 | 16,6 |
| 2,920 | 0,34 | 0,41 | 54,6 | 18,3 |
| 3,500 | 0,28 | 0,38 | 50,6 | 20,0 |
| 4,090 | 0,24 | 0,37 | 49,3 | 20,3 |
| 4,670 | 0,21 | 0,35 | 46,6 | 21,4 |
| 5,260 | 0,19 | 0,29 | 38,6 | 25,9 |
| 5,840 | 0,17 | 0,26 | 35,3 | 28,3 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig. 14, se obtienen los valores:

$$-0,8 = -\frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 1,25 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = \frac{1}{0,6} = 1,66 \text{ U/ml} = 1660 \text{ mU/ml}$$

(1,3) B-GLUCANASA

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: Laminarina, a concentración final 1mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de diferentes valores de pH.

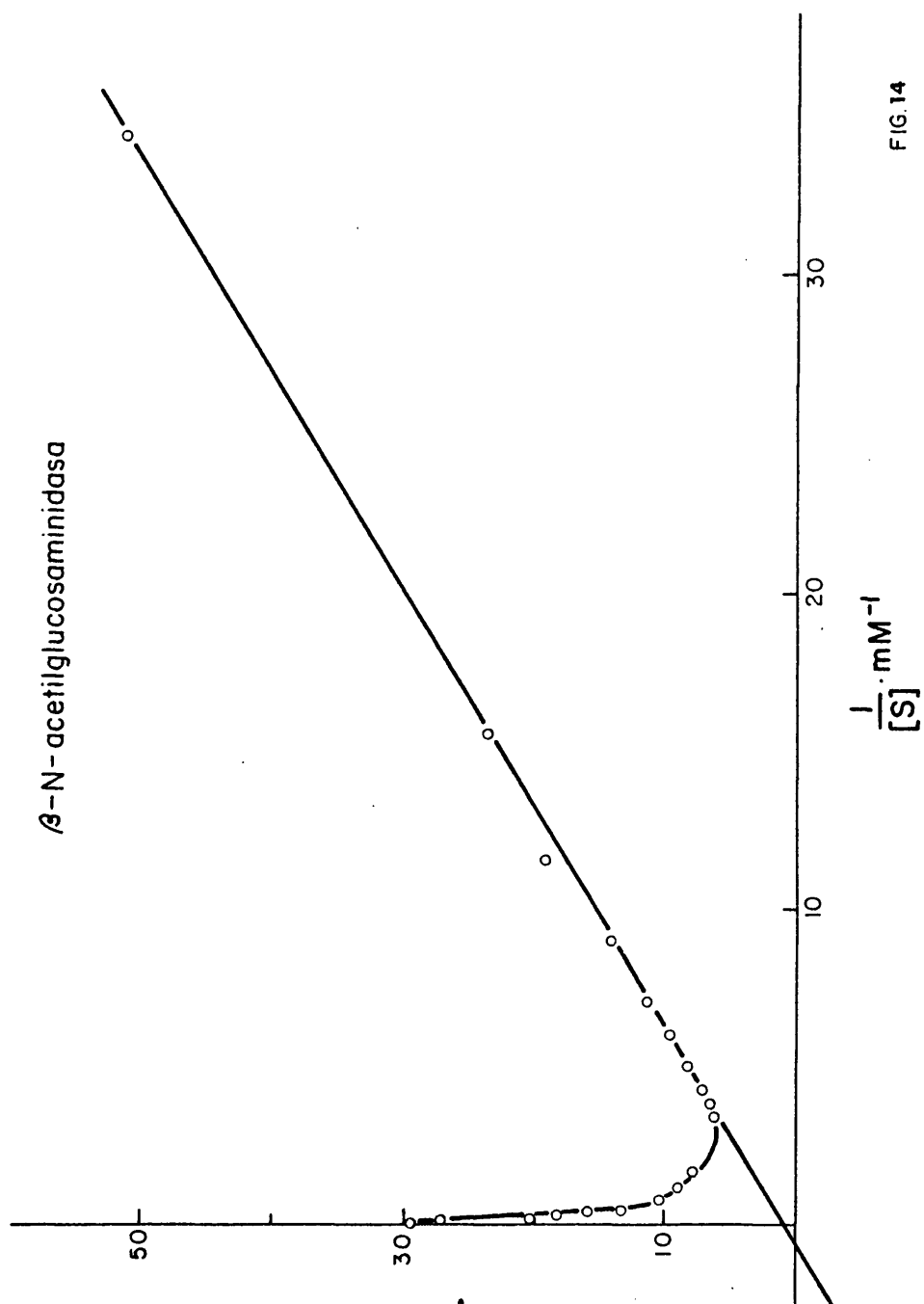
Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

Proteínas: 0,780 mg/ml de la solución de enzimas.

Tiempo de incubación: 10 minutos.

Los valores obtenidos fueron:

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 2,5 | 0,79 | 1067 |
| 3,0 | 0,80 | 1081 |
| 3,5 | 0,83 | 1121 |
| 4,0 | 0,88 | 1189 |
| 4,5 | 0,82 | 1108 |
| 5,0 | 0,77 | 1040 |
| 5,5 | 0,75 | 1013 |
| 6,0 | 0,65 | 878 |



| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 6,5 | 0,60 | 810 |
| 7,0 | 0,40 | 540 |
| 7,5 | 0,34 | 459 |
| 8,0 | 0,25 | 337 |
| 8,5 | 0,11 | 148 |
| 9,0 | 0,09 | 121 |

Los resultados obtenidos se representaron en la gráfica de la Fig.15 . El pH óptimo es de 4,0 unidades.

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: Laminarina, a concentración final de 1mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,0.

Volumen de solución de enzima: desde 10 a 60 μ l.

Tiempo de incubación: 25 minutos. Proteínas: 0,630 mg/ml.

Los resultados obtenidos fueron:

| Volumen de solución de enzima (μ l.) | Lectura U.A. | Act.específica (mU/mg) |
|----------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 10 | 0,20 | 29,36 |
| 15 | 0,35 | 52,06 |
| 20 | 0,50 | 73,33 |
| 25 | 0,54 | 93,97 |
| 30 | 0,70 | 102,85 |
| 35 | 0,74 | 108,73 |
| 40 | 0,90 | 132,22 |

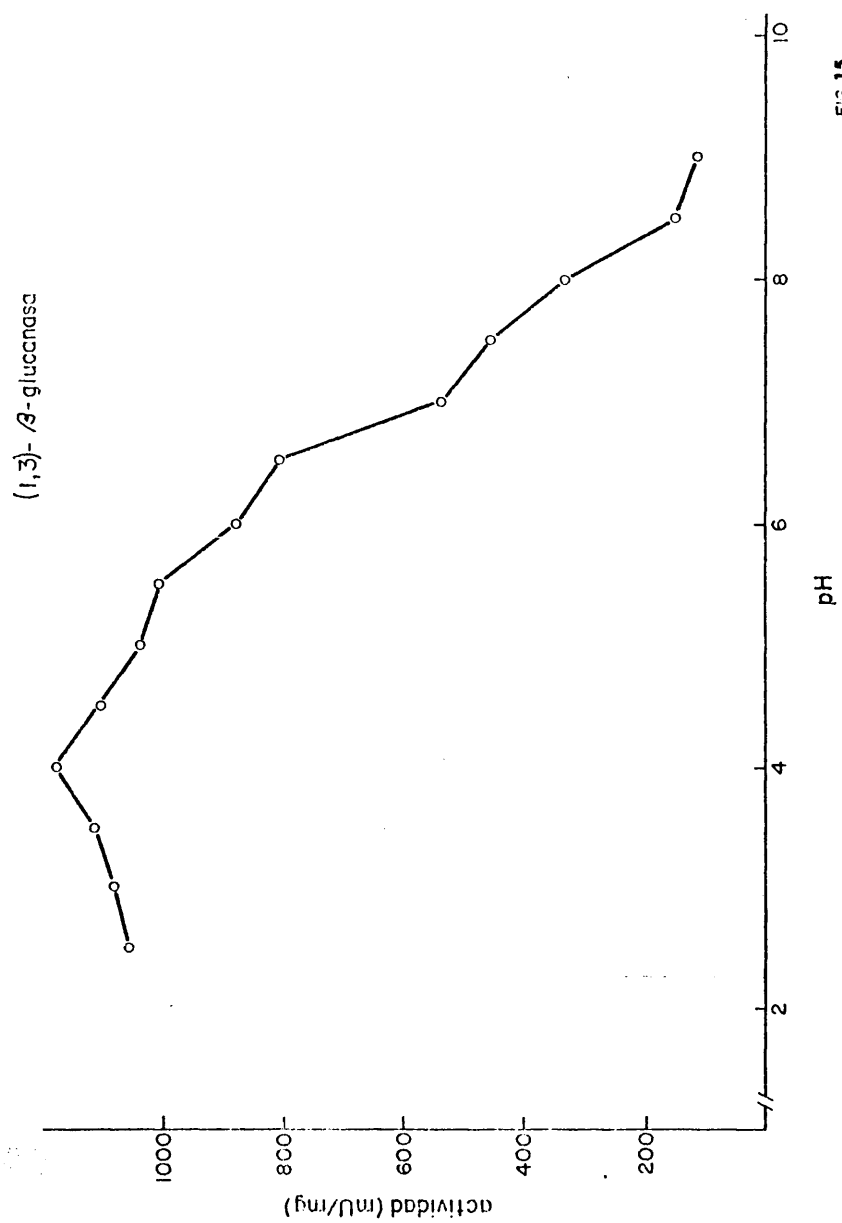


FIG. 15

111.

| <u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Act.específica (mU/mg)</u> |
|------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 45 | 0,98 | 143,96 |
| 50 | 1,00 | 146,82 |
| 55 | 1,04 | 153,50 |
| 60 | 1,06 | 155,71 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig.16 , observamos que a medida que aumenta la concentración de enzima, aumenta la actividad enzimática.

Determinación de la $V_{m\acute{a}x}$.(velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Laminarina, a concentraciones finales de 100 a 1800 mg/l.(Referido a equivalentes de glucosa, esta concentración es de 0,55 a 10 mM.), en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,0.

Volumen de solución de enzima: 140 μl.

Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzimas.

Tiempo de incubación: 10 minutos.

Los resultados obtenidos fueron:

| <u>Concentración de sustrato (mM)</u> | <u>$1/[S]$ mM^{-1}</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Actividad mU/ml</u> | <u>$(1/V) \cdot 10^3$ $1/U \cdot ml$</u> |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 0,55 | 1,80 | 0,255 | 354,1 | 2,80 |
| 1,11 | 0,90 | 0,441 | 613,2 | 1,63 |
| 1,66 | 0,60 | 0,520 | 728,0 | 1,37 |
| 2,22 | 0,45 | 0,603 | 838,3 | 1,20 |
| 2,77 | 0,36 | 0,630 | 870,4 | 1,15 |



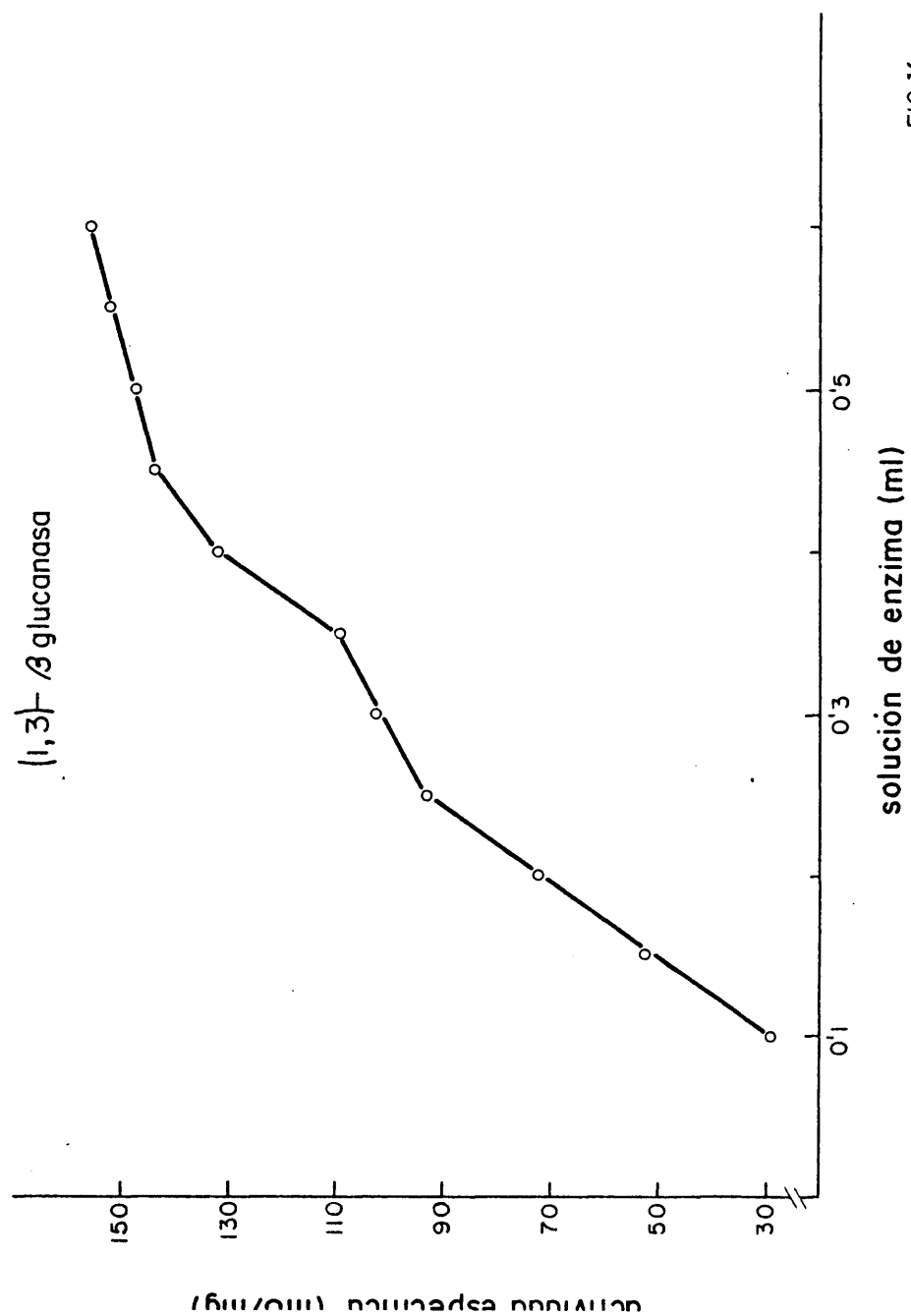


FIG.16

113.

| Concentración de sustrato (mM) | $1/[S]$ mM ⁻¹ | Lectura U.A. | Actividad mU/ml | $(1/V) \cdot 10^3$ 1/U/ml. |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------------|
| 3,33 | 0,30 | 0,660 | 916,1 | 1,09 |
| 3,88 | 0,25 | 0,662 | 920,0 | 1,08 |
| 4,44 | 0,22 | 0,695 | 964,9 | 1,03 |
| 5,00 | 0,20 | 0,700 | 972,8 | 1,02 |
| 5,55 | 0,18 | 0,696 | 967,7 | 1,03 |
| 6,66 | 0,15 | 0,750 | 1041,6 | 0,96 |
| 7,77 | 0,13 | 0,733 | 1017,7 | 0,98 |
| 8,88 | 0,11 | 0,800 | 1110,7 | 0,90 |
| 10,00 | 0,10 | 0,760 | 1053,9 | 0,94 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig. 17 ,
se obtienen los valores:

$$- 0,11 = - \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 9,09 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = \frac{1}{8,57} = 0,166 \text{ U/ml} = 166 \text{ mU/ml}$$

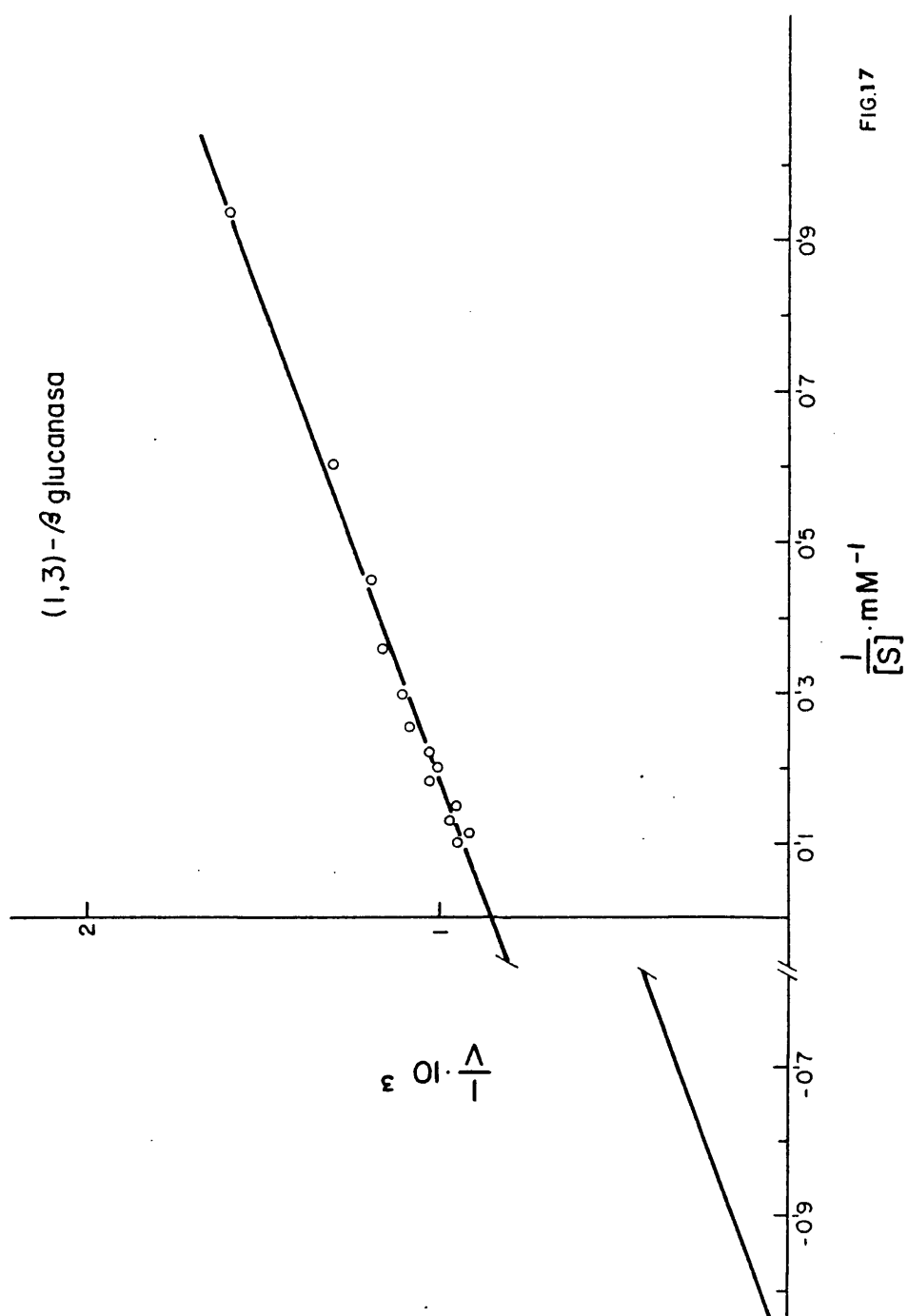


FIG.17

α -AMILASApH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: almidón soluble a concentración final de 1mg/ml, en
tampón de citrato-fosfato-borato 0,05 M de distin-
tos valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

Proteínas: 0,780 mg/ml. de la solución de enzima.

Tiempo de incubación: 35 minutos.

Los valores obtenidos fueron:

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 2,5 | 0,16 | 61,7 |
| 3,0 | 0,19 | 73,3 |
| 3,5 | 0,21 | 83,0 |
| 4,0 | 0,22 | 86,8 |
| 4,5 | 0,21 | 81,0 |
| 5,0 | 0,20 | 79,1 |
| 5,5 | 0,20 | 79,1 |
| 6,0 | 0,17 | 65,6 |
| 6,5 | 0,16 | 61,7 |
| 7,0 | 0,14 | 55,9 |
| 7,5 | 0,13 | 50,1 |
| 8,0 | 0,09 | 34,7 |
| 8,5 | 0,05 | 27,0 |
| 9,0 | 0,04 | 15,4 |

El pH óptimo obtenido fué de 4 unidades. Los resul-
tados obtenidos se encuentran representados en la gráfica de
la Fig. 18 .

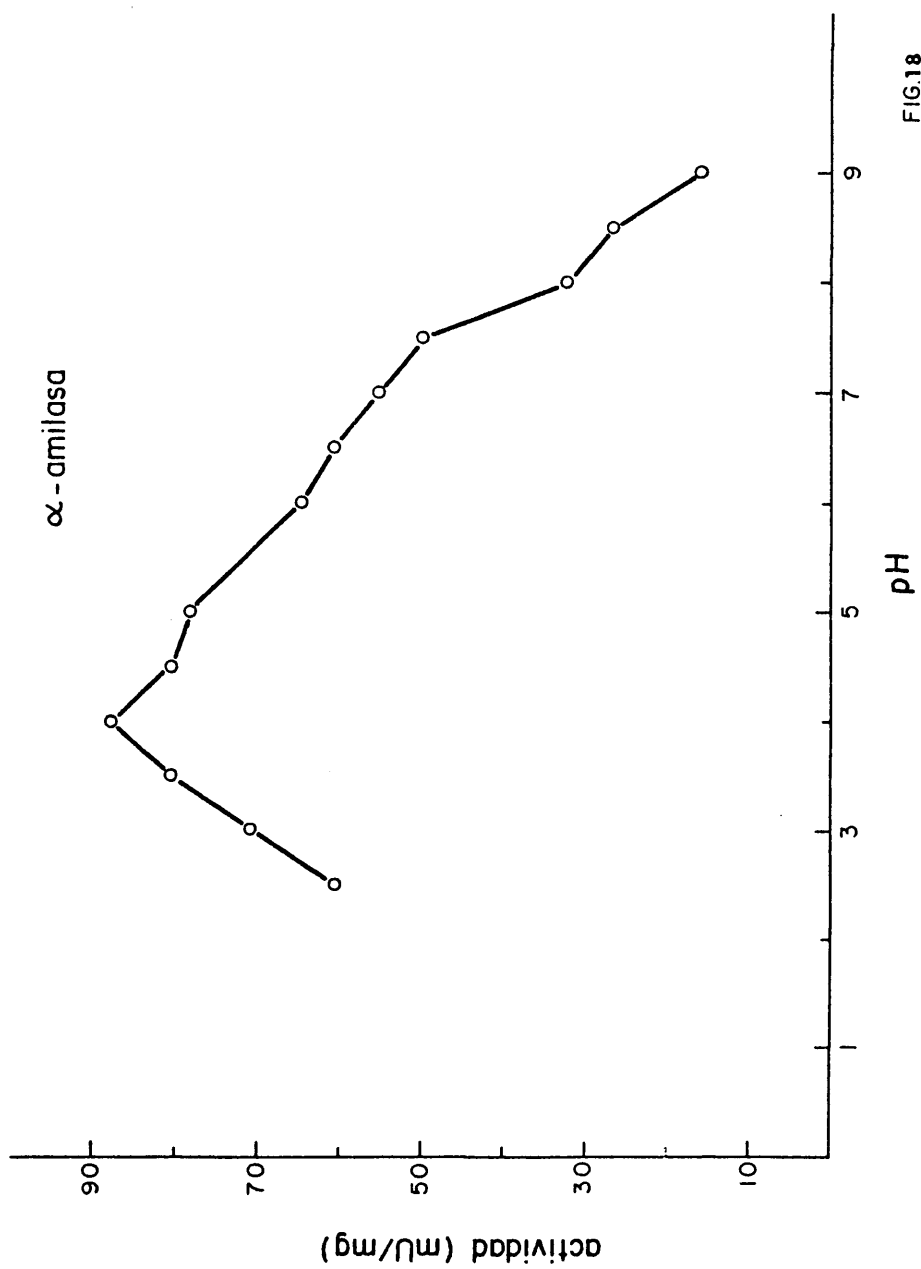


FIG.18

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: almidón soluble, a concentración final de 1mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,0.

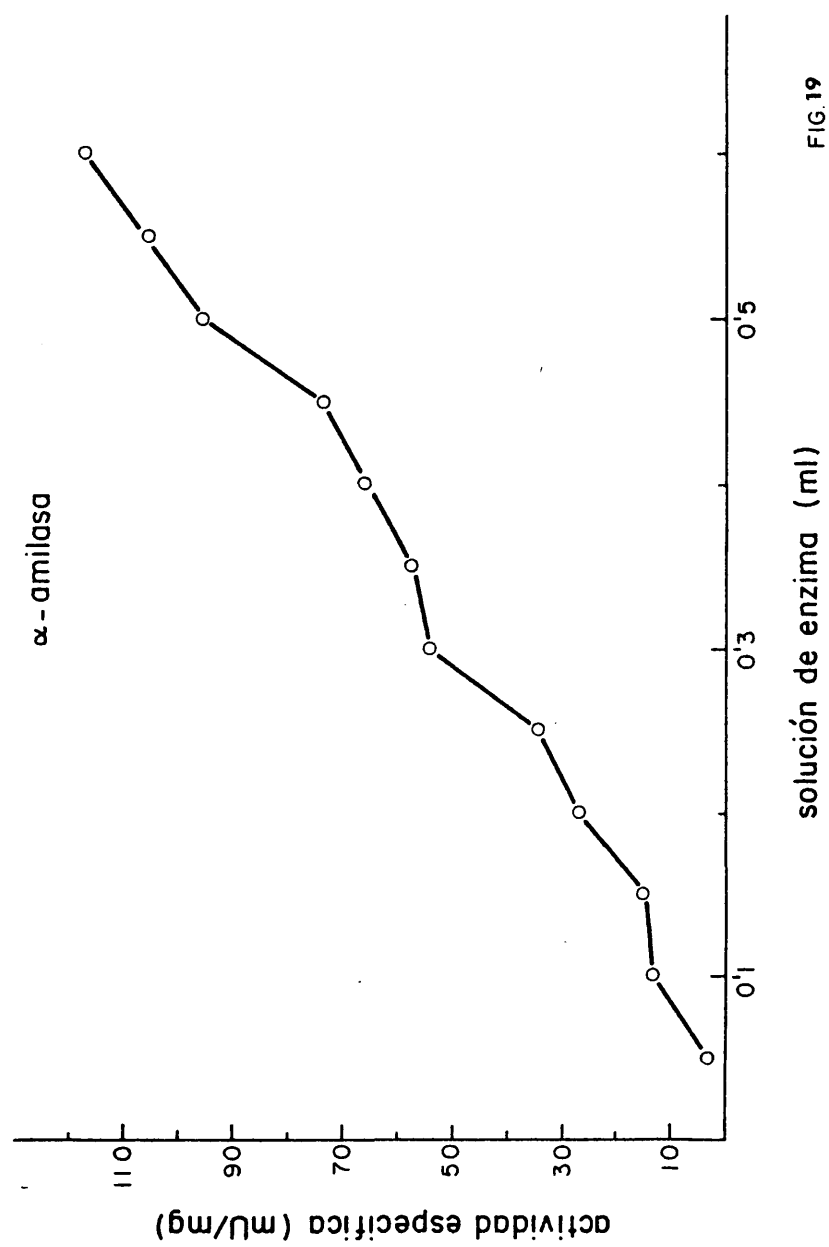
Volumen de solución de enzima: desde 5 a 60 μ l. Proteínas: 0,630 mg/ml

Tiempo de incubación: 15 minutos.

Los resultados obtenidos fueron:

| <u>Volumen de solución de enzima (μl)</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Act.específica (mU/mg)</u> |
|----------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| 5 | 0,01 | 3,65 |
| 10 | 0,05 | 13,46 |
| 15 | 0,06 | 14,68 |
| 20 | 0,11 | 26,94 |
| 25 | 0,14 | 34,28 |
| 30 | 0,22 | 53,88 |
| 35 | 0,23 | 56,33 |
| 40 | 0,27 | 66,13 |
| 45 | 0,30 | 73,48 |
| 50 | 0,39 | 95,52 |
| 55 | 0,43 | 105,32 |
| 60 | 0,48 | 117,57 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig. 19 , observamos que a medida que aumenta la concentración de enzima, aumenta la actividad enzimática.



Determinación de la Vmax (velocidad máxima) y Km (constante de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: almidón soluble a concentraciones finales de 100 a 1800 mg/l. (Referido a equivalentes de glucosa, esta concentración es de 0,55 a 10 mM), en tampón citrato-fosfato-borato de pH 4,0 0,05M.

Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 30 minutos. Los resultados obtenidos:

| Concentración de sustrato (mM) | $1/[S]$ mM ⁻¹ | Lectura U.A. | Actividad mU/ml | $(1/V) \cdot 10^3$ 1/U/ml |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------|
| 0,55 | 1,80 | 0,20 | 85 | 11,76 |
| 1,11 | 0,90 | 0,34 | 144 | 6,94 |
| 1,66 | 0,60 | 0,44 | 184 | 5,43 |
| 2,22 | 0,45 | 0,50 | 207 | 4,85 |
| 2,77 | 0,36 | 0,54 | 225 | 4,49 |
| 3,33 | 0,30 | 0,56 | 234 | 4,27 |
| 3,38 | 0,25 | 0,60 | 252 | 3,96 |
| 4,44 | 0,22 | 0,62 | 260 | 3,84 |
| 5,00 | 0,20 | 0,64 | 266 | 3,75 |
| 5,55 | 0,18 | 0,66 | 275 | 3,63 |
| 6,66 | 0,15 | 0,67 | 279 | 3,58 |
| 7,77 | 0,13 | 0,70 | 292 | 3,42 |
| 8,88 | 0,11 | 0,70 | 294 | 3,40 |
| 10,00 | 0,10 | 0,73 | 306 | 3,26 |

Representando estos resultados, en la gráfica de la Fig. 20 , se obtienen los valores:

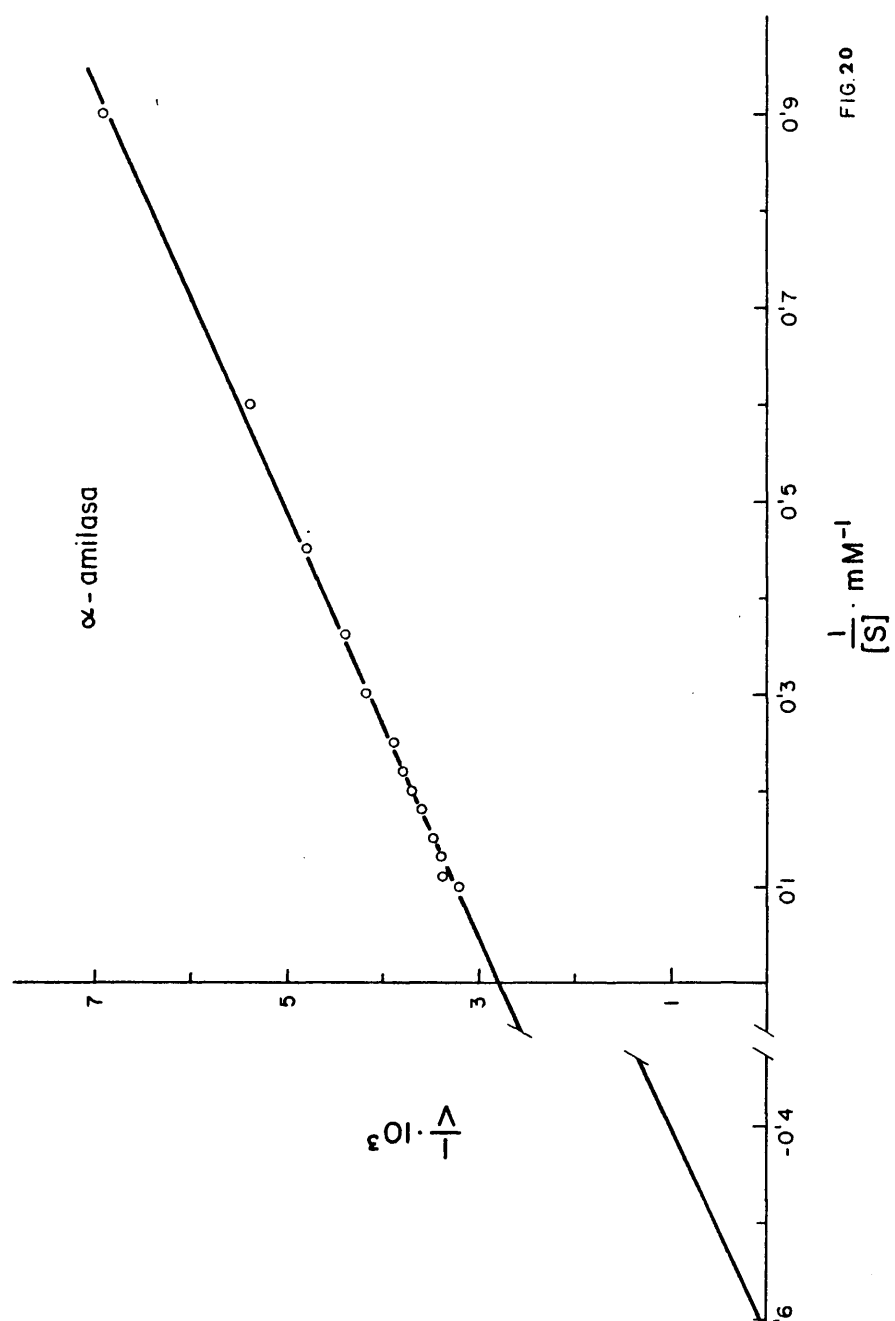


FIG. 20

$$- 0,615 = - \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 1,626 \text{ mM}$$

$$V_m = \frac{1}{2,8} = 0,357 \text{ U/ml} = 357 \text{ mU/ml}$$

POLIGALACTURONASA

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: poligalacturonato sódico, a concentración final de 0,5 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato - 0,05 M, de diferentes valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 150 µl.

Proteínas: 0,780 mg/ml de la solución de enzima.

Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 2,0 | 0,12 | 13,88 |
| 2,5 | 0,47 | 54,39 |
| 3,0 | 0,34 | 39,35 |
| 3,5 | 0,12 | 13,88 |
| 4,0 | 0,11 | 12,73 |
| 4,5 | 0,10 | 11,57 |
| 5,0 | 0,10 | 11,57 |
| 5,5 | 0,09 | 10,41 |
| 6,0 | 0,08 | 9,25 |
| 6,5 | 0,06 | 6,94 |
| 7,0 | 0,03 | 3,47 |

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 7,5 | 0,0 | 0,00 |
| 8,0 | 0,0 | 0,00 |
| 8,5 | 0,0 | 0,00 |
| 9,0 | 0,0 | 0,00 |

El pH óptimo obtenido fue de 2,5 unidades. Estos resultados se encuentran representados gráficamente en la Fig. 21.

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a concentración final de 0,5 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 2,5.

Volumen de solución de enzima de 5 a 40 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Volumen de solución de enzima (μ l) | Lectura U.A. | Act. específica (mU/mg) |
|---------------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| 5 | 0,030 | 3,40 |
| 10 | 0,035 | 4,00 |
| 15 | 0,040 | 4,60 |
| 20 | 0,055 | 6,40 |
| 25 | 0,060 | 6,90 |
| 30 | 0,085 | 9,80 |
| 35 | 0,100 | 11,60 |
| 40 | 0,110 | 12,70 |

Poligalacturonasa

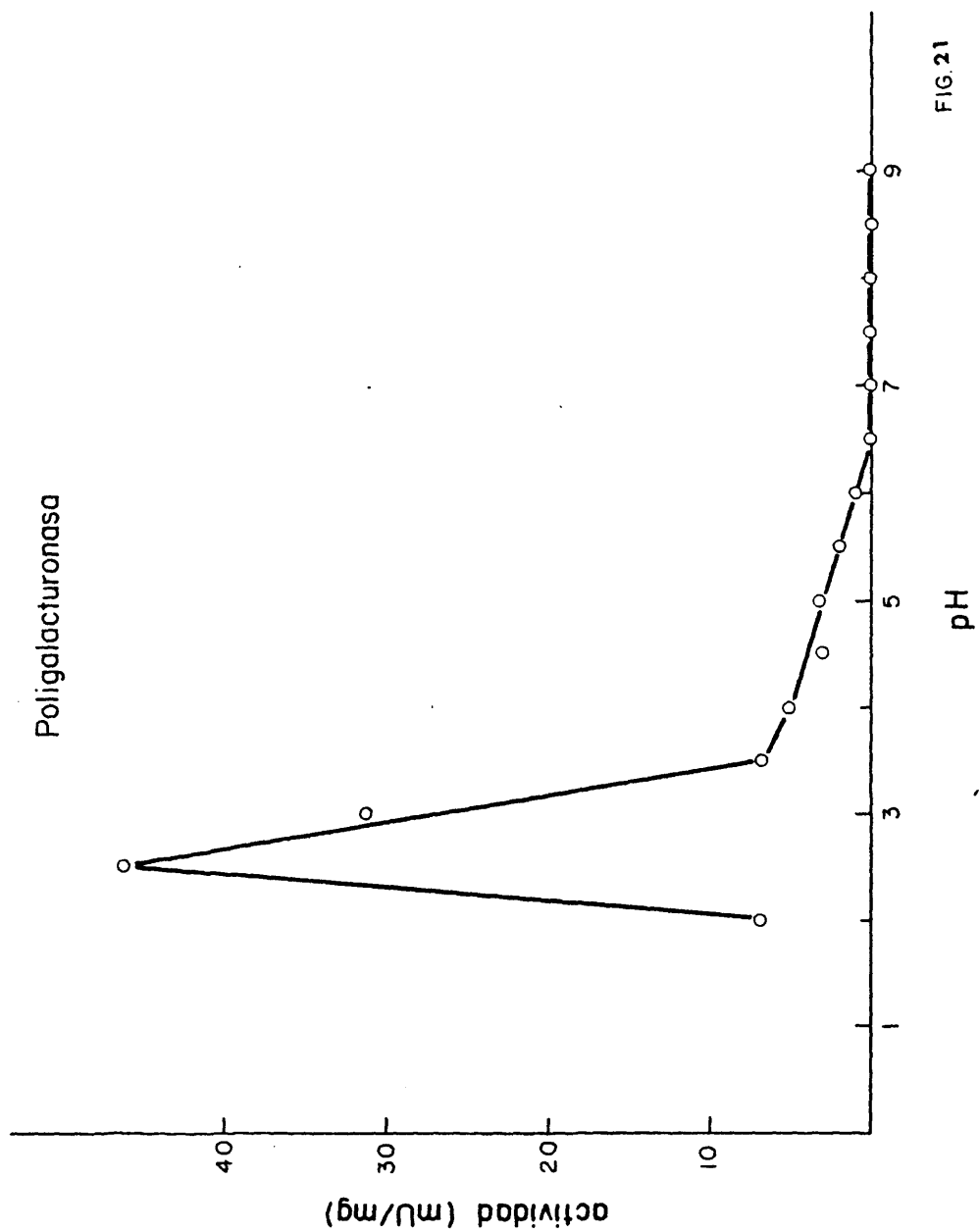


FIG. 21

Los resultados obtenidos se representaron en la Fig. 22 .

Determinación de la $V_{\text{máx}}$ (velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a concentraciones finales de 100 a 1800 mg/l. (Referido a equivalentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van de 0,51 a 9,28 mM), en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 2,5.

Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

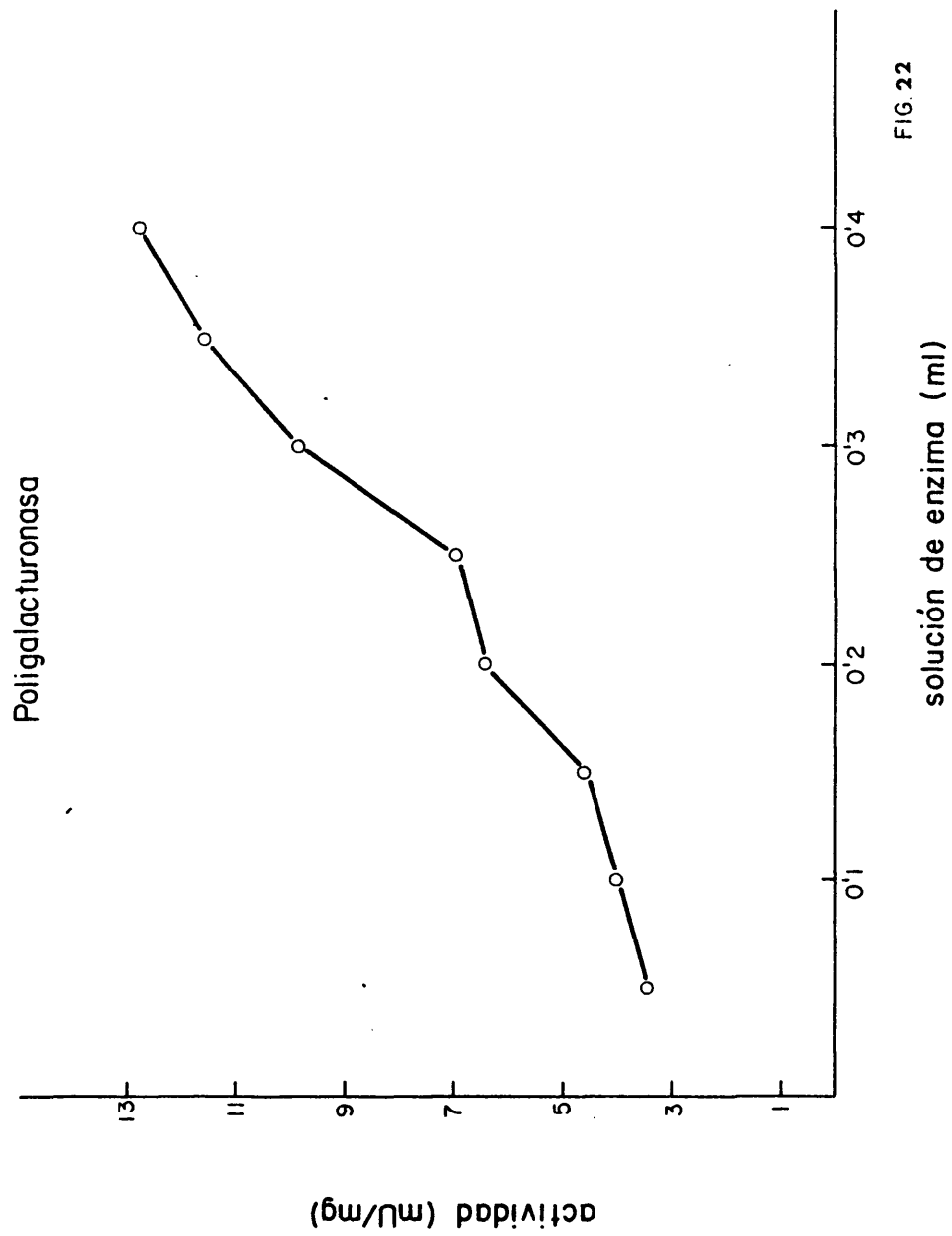
Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Concentraciones de sustrato (mM.) | $1/[S]$ mM ⁻¹ | Lectura U.A. | Actividad mU/ml | $(1/V) \cdot 10^3$ 1/U/ml |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------|
| 0,51 | 1,96 | 0,025 | 2,89 | 346,0 |
| 1,03 | 0,97 | 0,035 | 4,05 | 247,0 |
| 1,54 | 0,64 | 0,050 | 5,78 | 173,0 |
| 2,06 | 0,48 | 0,060 | 6,94 | 144,0 |
| 2,57 | 0,39 | 0,080 | 9,25 | 108,0 |
| 3,09 | 0,32 | 0,090 | 10,41 | 96,0 |
| 3,60 | 0,28 | 0,100 | 11,57 | 86,4 |
| 4,12 | 0,24 | 0,115 | 13,31 | 75,1 |
| 4,63 | 0,22 | 0,125 | 14,46 | 69,1 |
| 5,15 | 0,19 | 0,135 | 15,62 | 64,0 |
| 7,21 | 0,14 | 0,150 | 17,85 | 57,8 |
| 8,24 | 0,12 | 0,170 | 19,67 | 50,8 |
| 9,27 | 0,11 | 0,200 | 23,10 | 43,3 |

Representando estos resultados, en la gráfica de la fig.23 , se obtienen los valores:



$$\frac{1}{0,08} = - \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 12,5 \text{ mM}$$

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{1}{20} = 0,05 \text{ U/ml} = 50 \text{ mU/ml}$$

POLIMETILGALACTURONASA

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentración final de 1 mg/ml
 en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de diferen
 tes valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

Proteínas: 0,680 mg/ml de la solución de enzima.

Tiempo de incubación : 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/ mg) |
|-----|-----------------|----------------------------------|
| 2,5 | 0,22 | 16,97 |
| 3,0 | 0,23 | 17,74 |
| 3,5 | 0,23 | 17,74 |
| 4,0 | 0,24 | 18,51 |
| 4,5 | 0,24 | 18,51 |
| 5,0 | 0,24 | 18,51 |
| 5,5 | 0,22 | 17,36 |
| 6,0 | 0,13 | 10,03 |
| 6,5 | 0,10 | 7,70 |
| 7,0 | 0,09 | 6,90 |
| 7,5 | 0,08 | 6,50 |

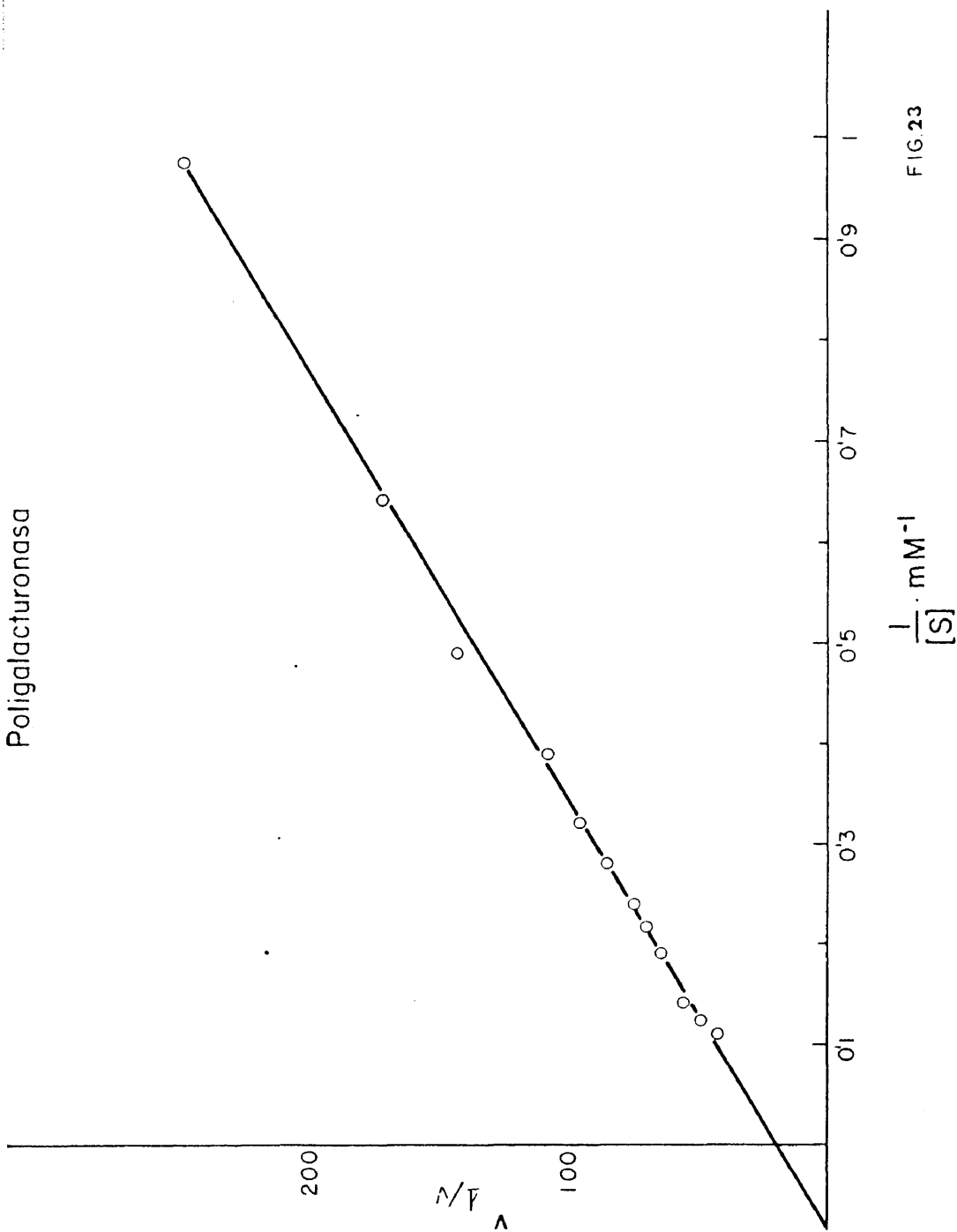


FIG. 23

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 8,0 | 0,08 | 6,50 |
| 8,5 | 0,08 | 6,50 |
| 9,0 | 0,08 | 6,50 |

El pH óptimo obtenido fué de 4 a 5 unidades. Estos resultados se encuentran representados en la gráfica de la Fig. 24 .

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana , a concentración final de 1mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato de pH 5, 0,05 M.

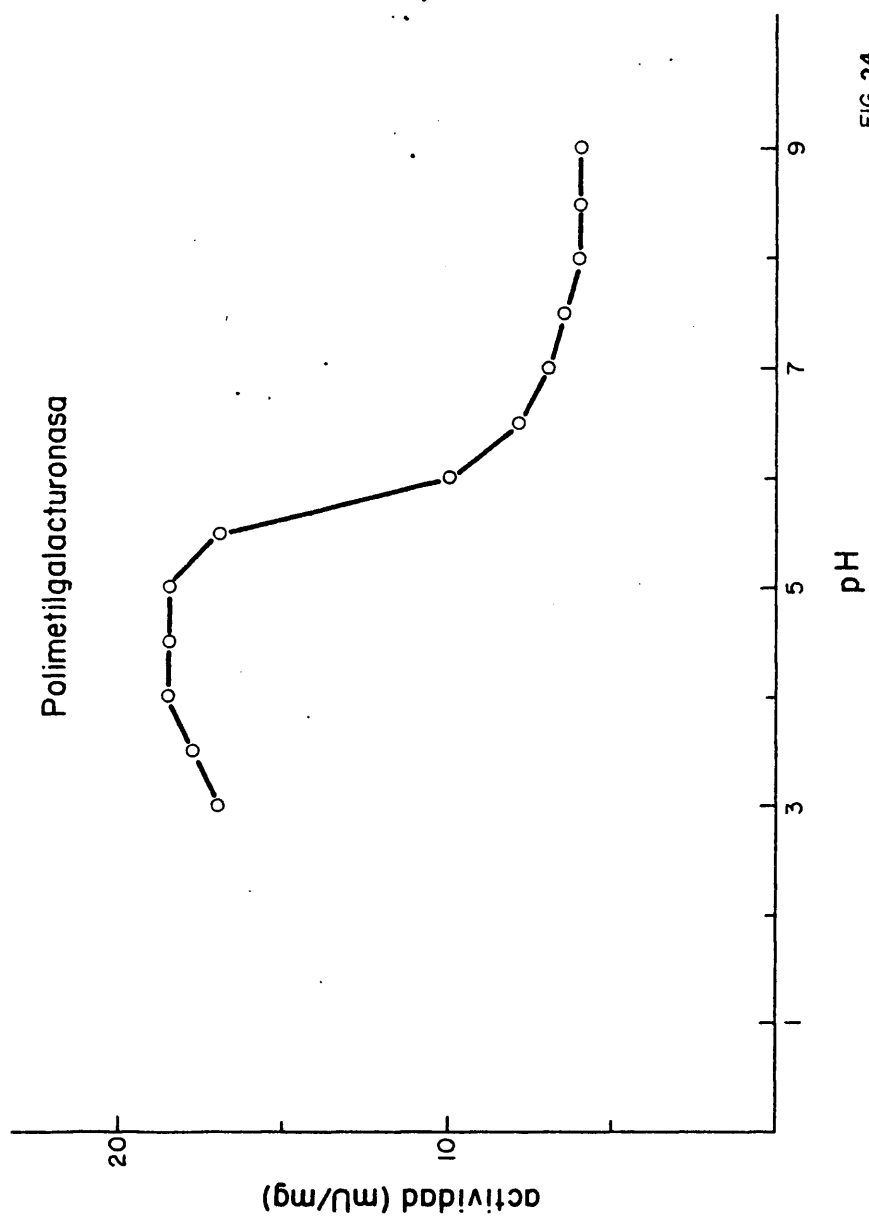
Volumen de solución de enzima: de 5 a 60 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Volumen de solución de enzima (μ l.) | Lectura U.A. | Act.específica (mU/mg) |
|----------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 5 | 0,21 | 6,43 |
| 10 | 0,27 | 8,25 |
| 15 | 0,35 | 10,71 |
| 20 | 0,41 | 12,53 |
| 25 | 0,45 | 13,77 |
| 30 | 0,51 | 15,60 |
| 35 | 0,55 | 16,82 |
| 40 | 0,58 | 17,74 |
| 45 | 0,63 | 19,28 |



| <u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Act. específica (mU/mg)</u> |
|------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 50 | 0,67 | 20,51 |
| 55 | 0,71 | 21,73 |
| 60 | 0,75 | 22,95 |

Los resultados obtenidos se representaron gráficamente en la Fig. 25 .

De esta gráfica podemos deducir, que a medida que aumenta la concentración del enzima, aumenta la actividad enzimática.

Determinación de la $V_{máx}$ (velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentraciones finales de 300 a 1800 mg/l (referido a equivalentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van de 0,65 a 0,11 mM), en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 5.

Volumen de solución de enzima: 120 μl.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 1 hora.

| <u>Concentraciones de sustrato (mM)</u> | <u>1/[S] mM⁻¹</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Actividad mU/ml</u> | <u>(1/V) . 10³ 1/U/ml</u> |
|---------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------------|
| 1,54 | 0,65 | 0,08 | 18,5 | 54,05 |
| 2,06 | 0,48 | 0,10 | 23,8 | 42,57 |
| 2,57 | 0,39 | 0,12 | 27,8 | 35,09 |
| 3,09 | 0,32 | 0,15 | 34,4 | 29,00 |
| 3,60 | 0,28 | 0,16 | 37,0 | 27,01 |
| 4,12 | 0,24 | 0,18 | 41,6 | 24,00 |
| 4,63 | 0,22 | 0,20 | 46,2 | 21,64 |

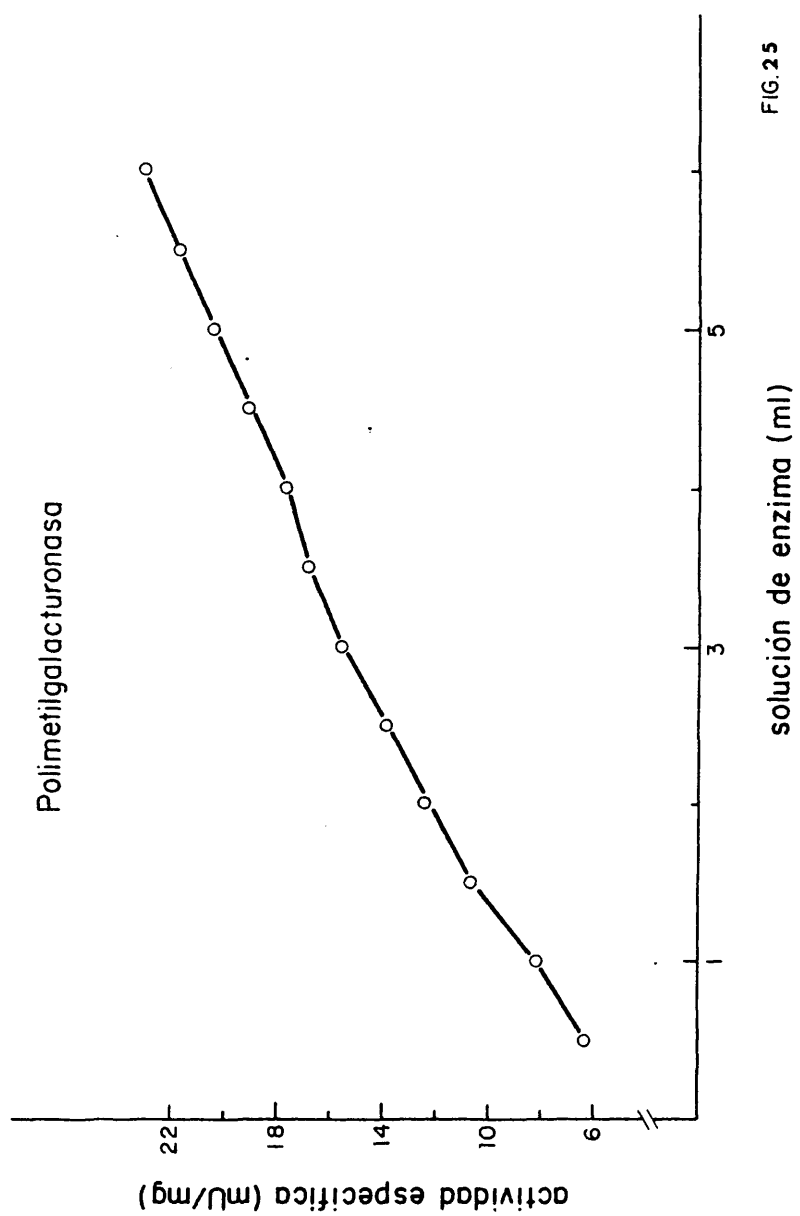


FIG. 25

| Concentraciones de sustrato (mM) | 1/[S] mM ⁻¹ | Lectura U.A. | Actividad mU/ml | (1/V).10 ³ 1/U/ml |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------------|
| 5,15 | 0,19 | 0,23 | 53,2 | 18,79 |
| 6,18 | 0,16 | 0,27 | 62,5 | 16,00 |
| 7,21 | 0,14 | 0,30 | 69,4 | 14,40 |
| 8,24 | 0,12 | 0,34 | 78,7 | 12,70 |
| 9,27 | 0,11 | 0,36 | 83,3 | 12,00 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig. 26 , se obtienen los valores:

$$-0,5 = - \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 2 \text{ mM.}$$

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{1}{4} = 0,25 \text{ U/ml} = 250 \text{ mU/ml.}$$

EXOPECTINLIASA

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentraciones finales de 1 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M, de diferentes valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 140 µl.

Proteínas: 0,680 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

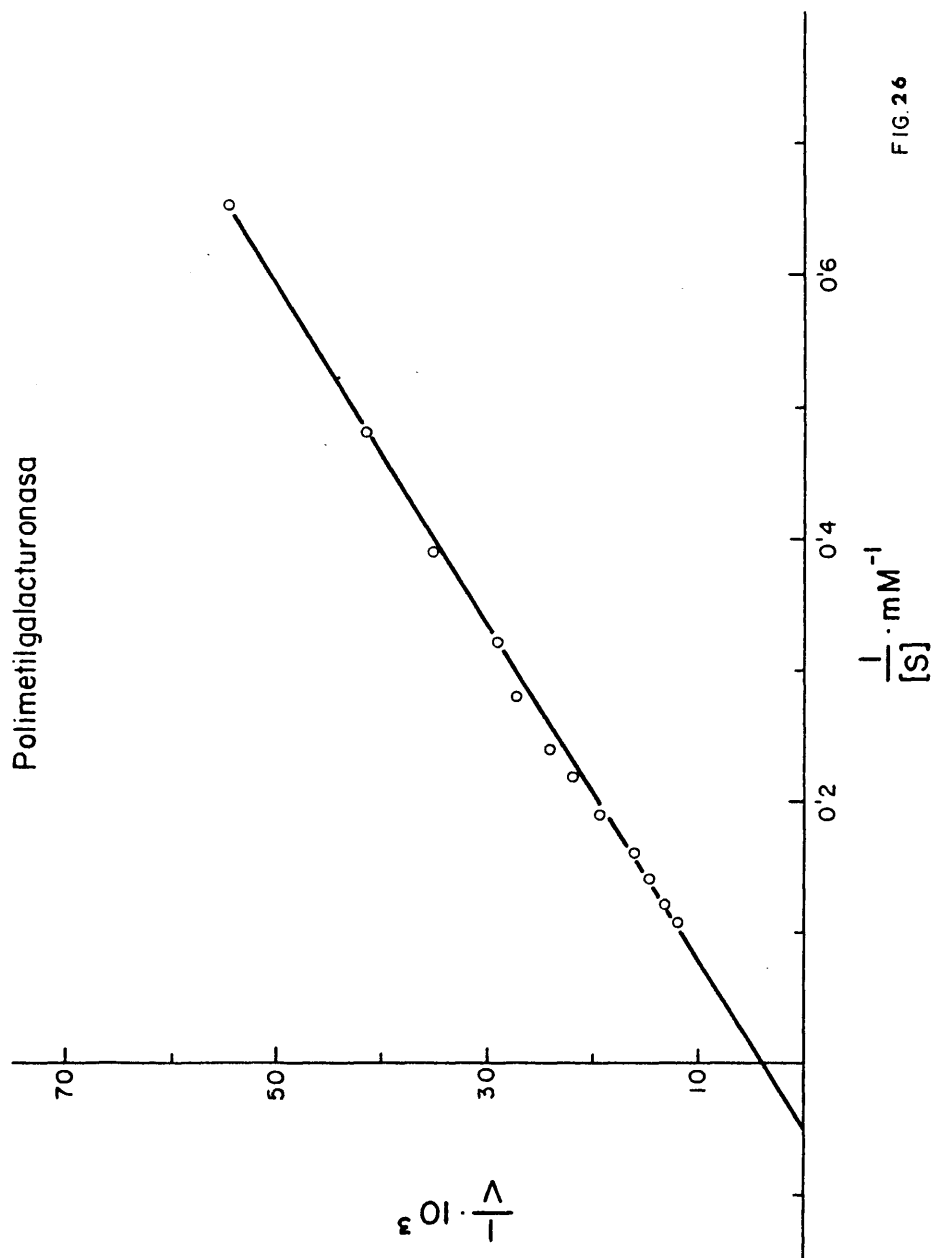


FIG. 26

| pH | Lectura incremento U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|----------------------------|---------------------------------|
| 2,5 | 0,00 | 0,0 |
| 3,0 | 0,00 | 0,0 |
| 3,5 | 0,00 | 0,0 |
| 4,0 | 0,00 | 0,0 |
| 4,5 | 0,00 | 0,0 |
| 5,0 | 0,00 | 0,0 |
| 5,5 | 0,00 | 0,0 |
| 6,0 | 0,01 | 2,0 |
| 6,5 | 0,05 | 10,0 |
| 7,0 | 0,14 | 30,0 |
| 7,5 | 0,15 | 32,0 |
| 8,0 | 0,18 | 39,0 |
| 8,5 | 0,03 | 6,0 |
| 9,0 | 0,01 | 3,0 |

El pH óptimo fué de 8 unidades. Estos resultados, se encuentran representados en la gráfica de la fig. 27 .

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentración final de 1mg/ml
en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 8,0.

Volumen de solución de enzima: de 5 a 40 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación : 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

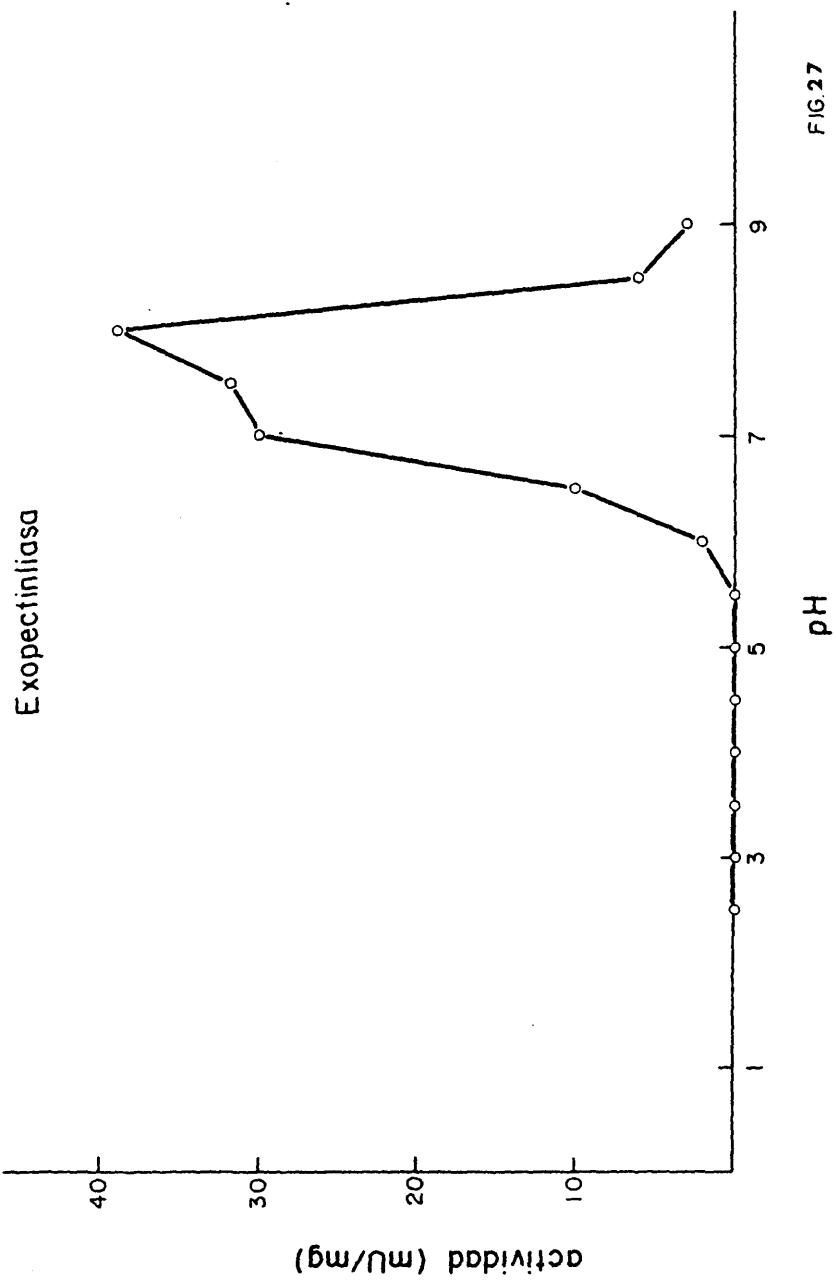


FIG. 27

| <u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u> | <u>Lectura incremento U.A.</u> | <u>Act. específica (mU/mg)</u> |
|------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 5 | 0,06 | 13,04 |
| 10 | 0,05 | 10,86 |
| 15 | 0,03 | 6,52 |
| 20 | 0,02 | 4,34 |
| 25 | 0,01 | 2,17 |
| 30 | 0,00 | 0,00 |
| 35 | 0,00 | 0,00 |
| 40 | 0,00 | 0,00 |

Los resultados obtenidos se representaron gráficamente en la Fig. 28.

De esta gráfica, podemos deducir que a medida que aumenta la concentración de enzima, disminuye la actividad enzimática. Este resultado nos hizo pensar en la presencia de un inhibidor en la solución de enzima, por lo que repetimos este mismo experimento con solución de enzima dializada (Solución de enzima en tampón citrato-fosfato borato 0,05 M de pH 8,0, fué dializada frente al mismo tampón a 4°C, durante 3 días).

Los resultados obtenidos fueron:

| <u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u> | <u>Lectura incremento U.A.</u> | <u>Act. específica (mU/mg)</u> |
|------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 5 | 0,01 | 2,17 |
| 10 | 0,03 | 6,52 |
| 15 | 0,04 | 8,60 |
| 20 | 0,06 | 13,00 |
| 25 | 0,07 | 15,20 |
| 30 | 0,08 | 17,30 |
| 35 | 0,09 | 19,50 |

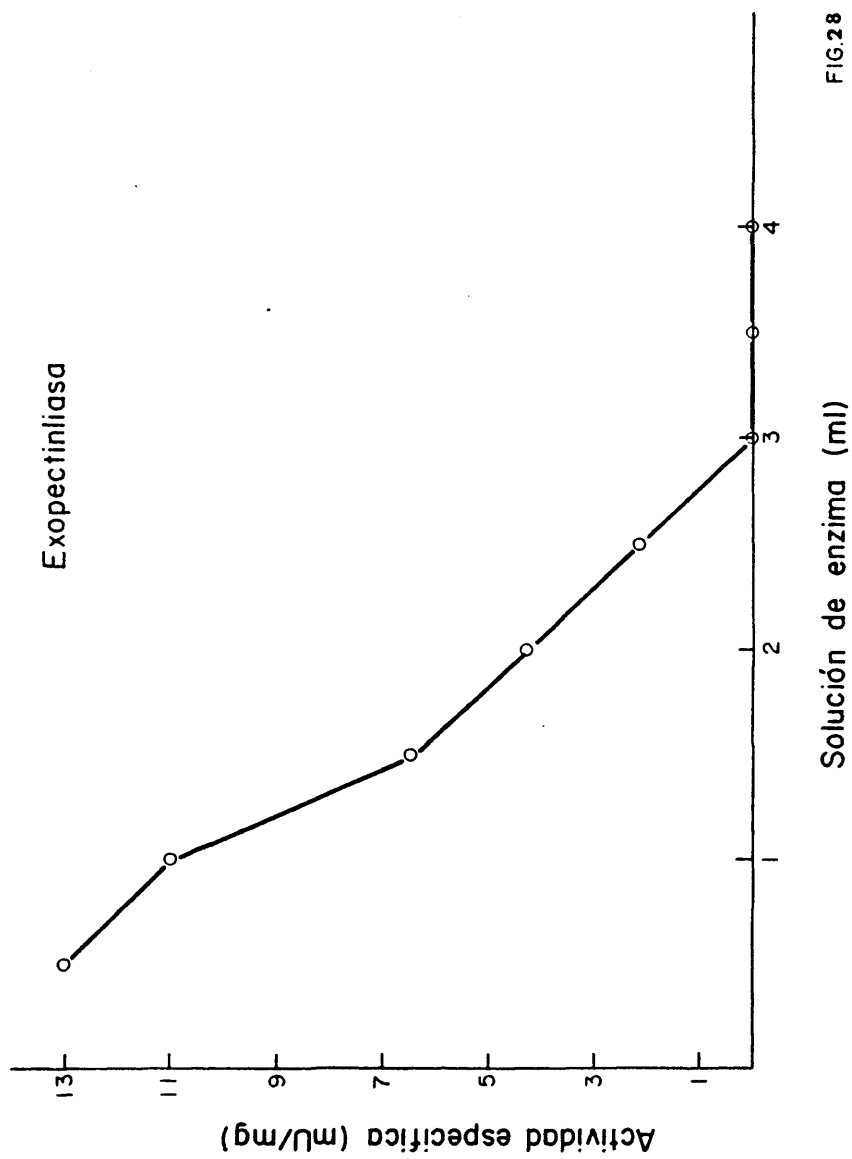


FIG.28

Los resultados obtenidos, se encuentran representados en la gráfica de la Fig. 29 .

De esta gráfica podemos deducir, que a medida que aumenta la concentración de enzima, aumenta la actividad enzimática. Este resultado indica, que el inhibidor que se encontraba en la solución de enzima, es de pequeño tamaño o bajo Pm, debido a que desaparece en la diálisis.

Determinación de la $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentraciones finales de 100 a 1000 mg/l (referido a equivalentes de galacturónico, estas concentraciones van de 1,94 a 0,19 mM), en tampón citrato-fosfato-borato de pH 8,0 0,05 M.

Volumen de solución de enzima: 100 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 5 horas. Los resultados obtenidos:

| Concentraciones de sustrato(mM) | $1/[S]$ mM^{-1} | Lectura incremento U.A. | Actividad mU/ml | $(1/V) \cdot 10^3$ $1/U/ml$ |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 0,51 | 1,96 | 0,045 | 9,7 | 10,3 |
| 1,03 | 0,97 | 0,090 | 19,0 | 5,2 |
| 1,54 | 0,64 | 0,115 | 25,0 | 4,0 |
| 2,06 | 0,48 | 0,130 | 28,0 | 3,6 |
| 2,57 | 0,39 | 0,140 | 30,0 | 3,3 |
| 3,09 | 0,32 | 0,170 | 36,0 | 2,8 |
| 3,60 | 0,28 | 0,150 | 32,0 | 3,1 |
| 4,12 | 0,24 | 0,170 | 36,0 | 2,8 |
| 4,63 | 0,22 | 0,180 | 39,0 | 2,5 |
| 5,15 | 0,19 | 0,210 | 45 | 2,2 |

Exopectinlinasa

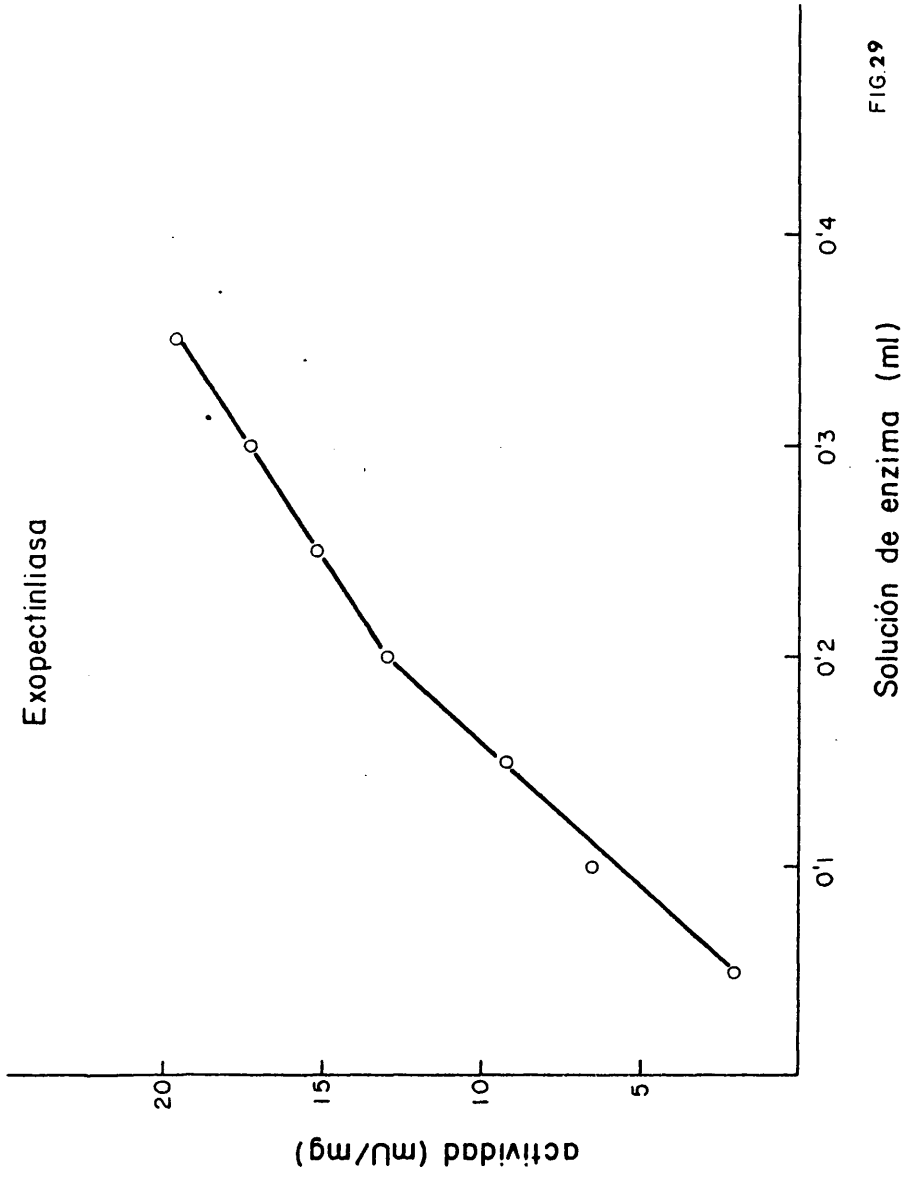


FIG. 29

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig.30 , se obtienen los valores:

$$- 0,33 = - \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 3,03 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = \frac{1}{14} = 0,071 \text{ U/ml} = 71 \text{ mU/ml.}$$

ENDOPECTINLIASA

pH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentracion final de 1mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de diferentes valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 100 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| pH | Lectura | | Act. específica (U/mg) |
|-----|---------|-------|----------------------------|
| | t_0 | t_5 | |
| 2,5 | 4'29" | 3'51" | 14,1 |
| 3,5 | 4'36" | 3'30" | 23,9 |
| 4,0 | 4'35" | 3'39" | 20,3 |
| 4,5 | 4'35" | 3'47" | 17,4 |
| 5,0 | 4'36" | 3'50" | 16,6 |
| 5,5 | 4'35" | 3'45" | 18,8 |
| 6,0 | 4'40" | 3'38" | 22,1 |
| 7,0 | 4'45" | 3'44" | 21,4 |
| 8,0 | 4'41" | 3'51" | 17,8 |
| 8,5 | 4'36" | 3'52" | 15,9 |

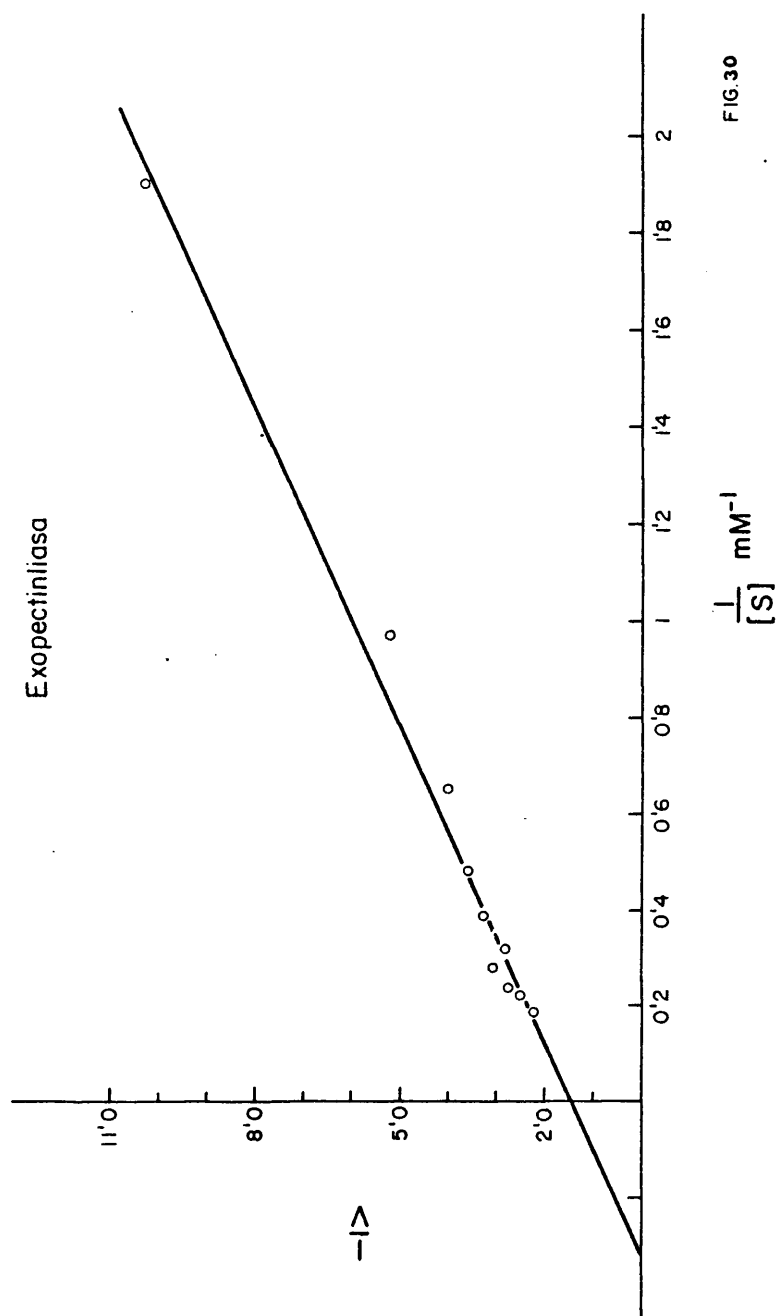


FIG. 30

El pH óptimo fué de 3,5 unidades. Estos resultados se encuentran representados en la Fig. 31 .

Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentración final de 1mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato de pH 3,5 0,05M.

Volumen de solución de enzima: de 5 a 40 μ l. de solución por 0,4ml. de sustrato

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Volumen de solución de enzima (μ l.) | Lectura t_0 | Lectura t_5 | Act. específica (U/mg) |
|----------------------------------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| 5 | 3'49" | 3'35" | 6,11 |
| 10 | 3'50" | 3'28" | 9,56 |
| 15 | 3'52" | 3'25" | 11,63 |
| 20 | 3'60" | 3'24" | 15,00 |
| 25 | 3'52" | 3'24" | 12,07 |
| 30 | 3'54" | 3'27" | 11,54 |
| 35 | 3'47" | 3'22" | 11,01 |
| 40 | 3'49" | 3'26" | 10,04 |

Los resultados obtenidos, se representaron en la gráfica de la Fig. 32 .

De esta gráfica, podemos deducir, que a medida que aumenta la concentración de enzima disminuye la actividad enzimática. Este resultado, semejante al obtenido en la Exopectinliasa, nos hizo pensar en la presencia de un inhibidor en la solución del enzima, por lo que repetimos el mismo experi-

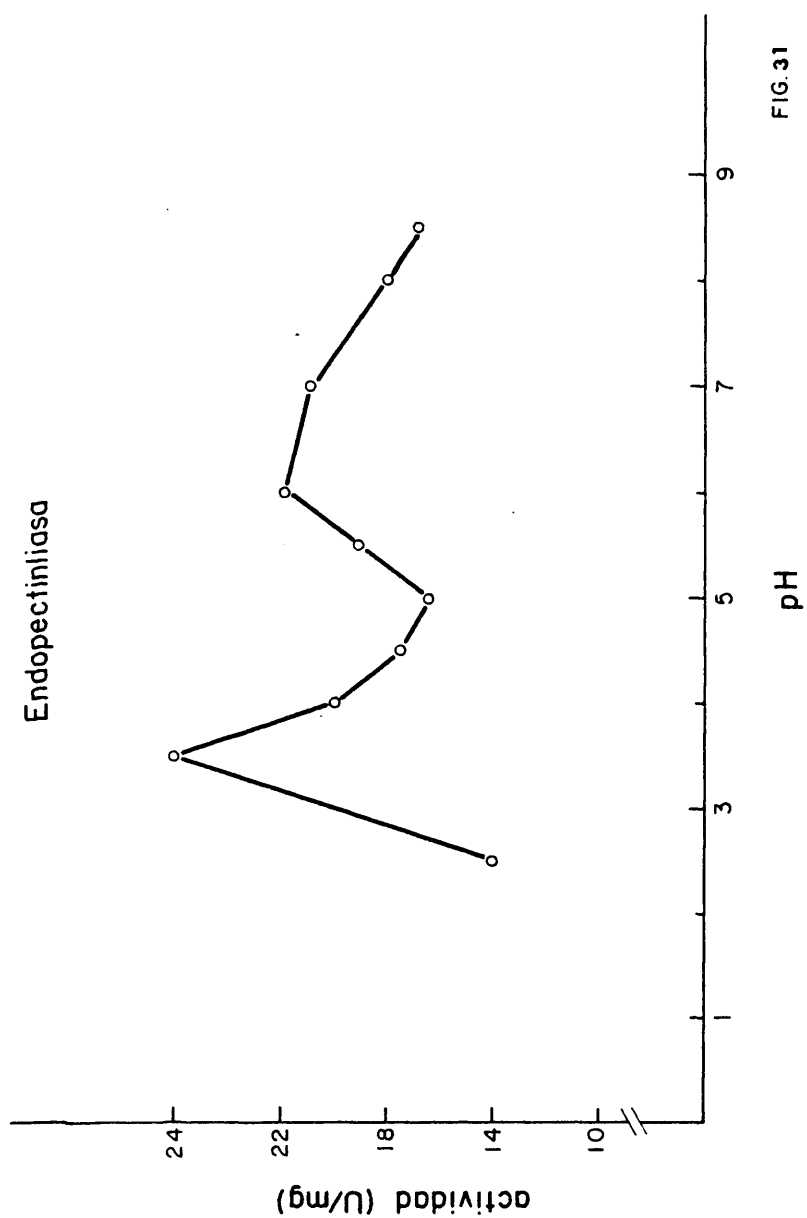


FIG. 31

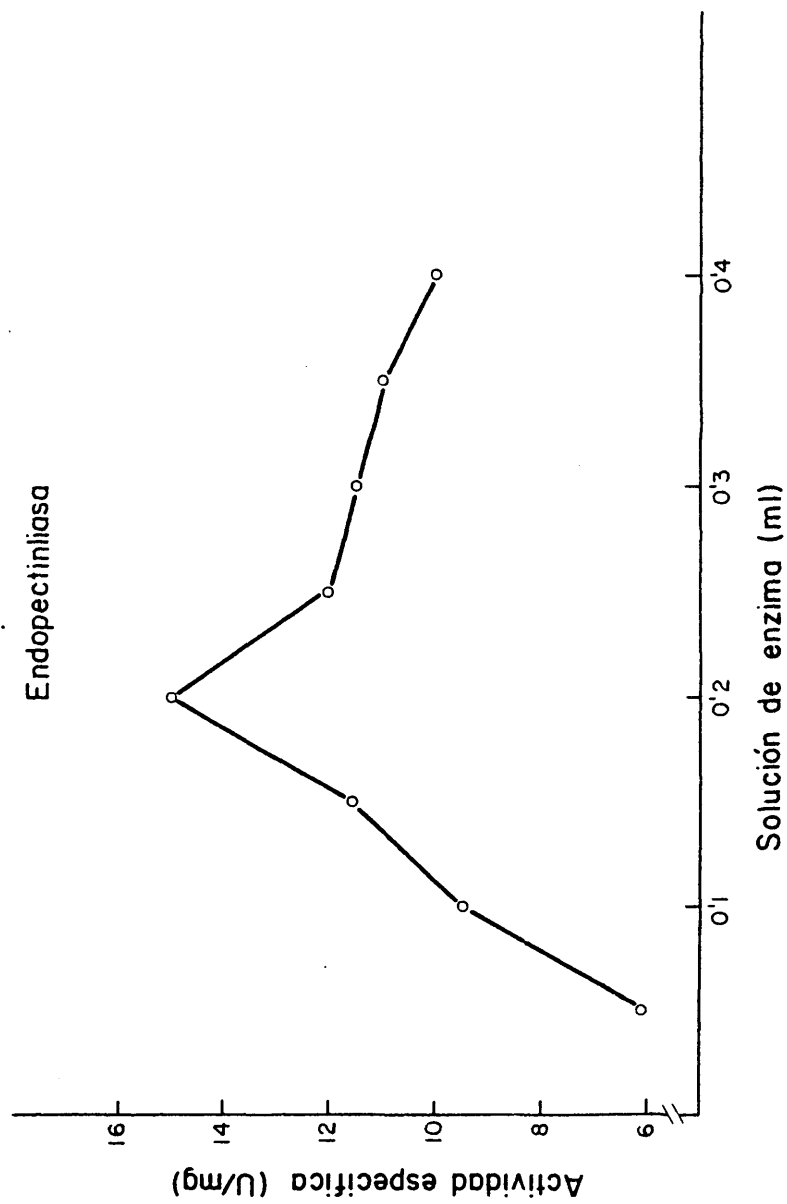


FIG.32

mento con solución de enzima dializada, igual que para la -
exopectinliasa.

Los resultados obtenidos fueron:

| Volumen de solución de enzima (μ l.) | Lectura | | Act.especifica (U/mg) |
|----------------------------------------------|---------|-------|--------------------------|
| | t_o | t_5 | |
| 5 | 3'38" | 3'36" | 0,91 |
| 10 | 3'39" | 3'33" | 2,73 |
| 15 | 3'36" | 3'28" | 3,70 |
| 20 | 3'41" | 3'25" | 7,23 |
| 25 | 3'45" | 3'20" | 11,11 |
| 30 | 3'49" | 3'20" | 12,66 |
| 35 | 3'52" | 3'20" | 13,79 |

Los resultados obtenidos, se encuentran representados en la gráfica de la Fig. 33 .

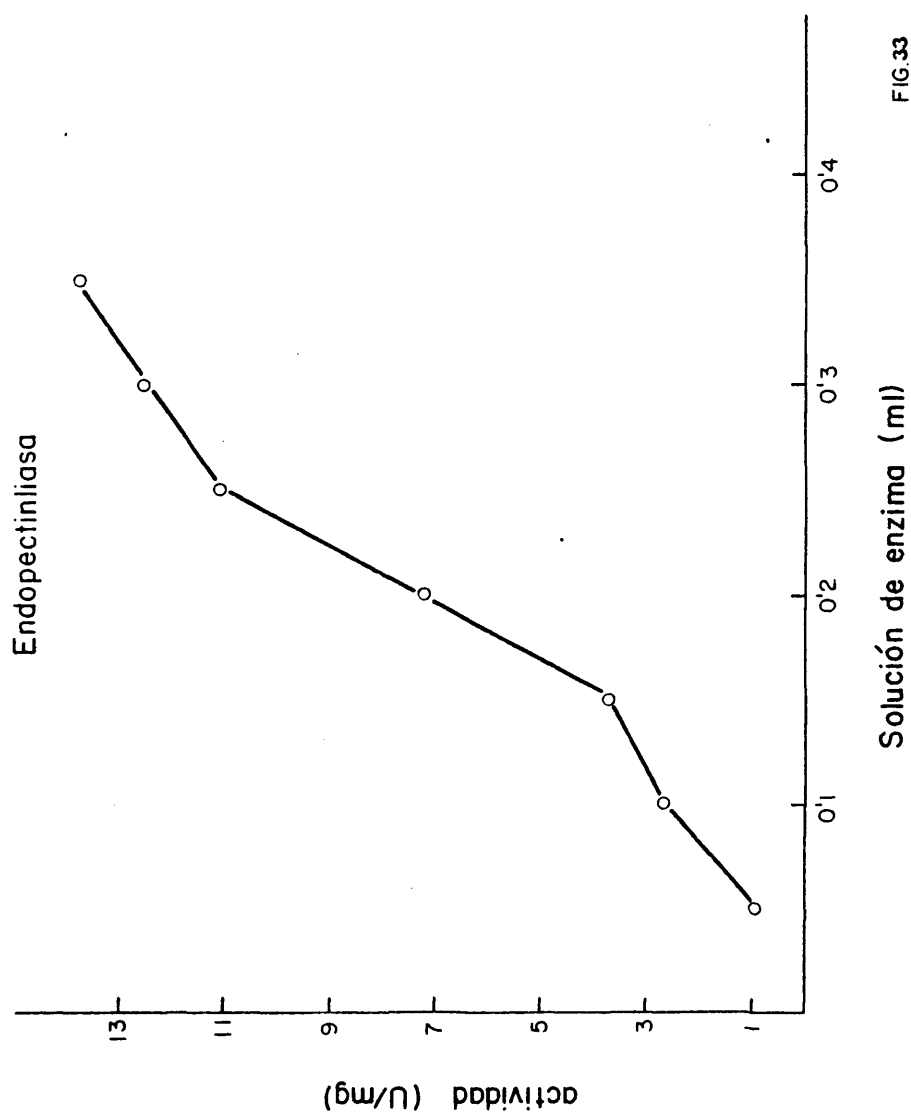
De esta gráfica podemos deducir, que a medida que aumenta la concentración de enzima aumenta la actividad enzimática. Este resultado indica, igual que para la exopectinliasa, que el inhibidor que se encontraba en la solución de enzima ha desaparecido en la diálisis.

Determinación de la V_{max} (velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentraciones finales de 100 a 1800 mg/l (Referido a equivalentes de galacturónico, estas concentraciones van de 0,51 a 9,27 mM), en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 3,5.

Volumen de solución de enzima: 140 μ l.

Proteínas: 0,630 mg/ml de solución de enzima.



Tiempo de incubación: 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Concentraciones de sustrato (mM) | $1/[S]$ mM^{-1} | Lectura | | Actividad (U/ml) | (1/V) $1/\text{U/ml}$ |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------|-------|---------------------|--------------------------|
| | | t_0 | t_5 | | |
| 0,51 | 1,96 | 2'55" | 2'53" | 1,14 | 0,87 |
| 1,03 | 0,97 | 2'58" | 2'53" | 2,80 | 0,36 |
| 1,54 | 0,64 | 3'07" | 3'00" | 3,74 | 0,27 |
| 2,06 | 0,48 | 3'03" | 2'56" | 4,91 | 0,20 |
| 2,57 | 0,39 | 3'05" | 2'55" | 5,40 | 0,18 |
| 3,09 | 0,32 | 3'08" | 2'56" | 6,38 | 0,16 |
| 3,60 | 0,28 | 3'13" | 2'59" | 7,25 | 0,14 |
| 4,12 | 0,24 | 3'15" | 3'01" | 7,25 | 0,14 |
| 4,63 | 0,22 | 3'20" | 3'03" | 8,50 | 0,12 |
| 5,15 | 0,19 | 3'23" | 3'03" | 9,85 | 0,10 |
| 6,18 | 0,16 | 3'31" | 3'05" | 12,32 | 0,08 |
| 7,21 | 0,14 | 3'40" | 3'11" | 13,18 | 0,07 |
| 8,24 | 0,12 | 3'48" | 3'16" | 14,03 | 0,07 |
| 9,27 | 0,11 | 4'02" | 3'25" | 15,28 | 0,06 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig. 34, se obtienen los valores:

$$-0,11 = -\frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 9,09 \text{ mM}$$

$$V_{\text{máx}} = \frac{1}{0,04} = 25 \text{ U/ml}$$

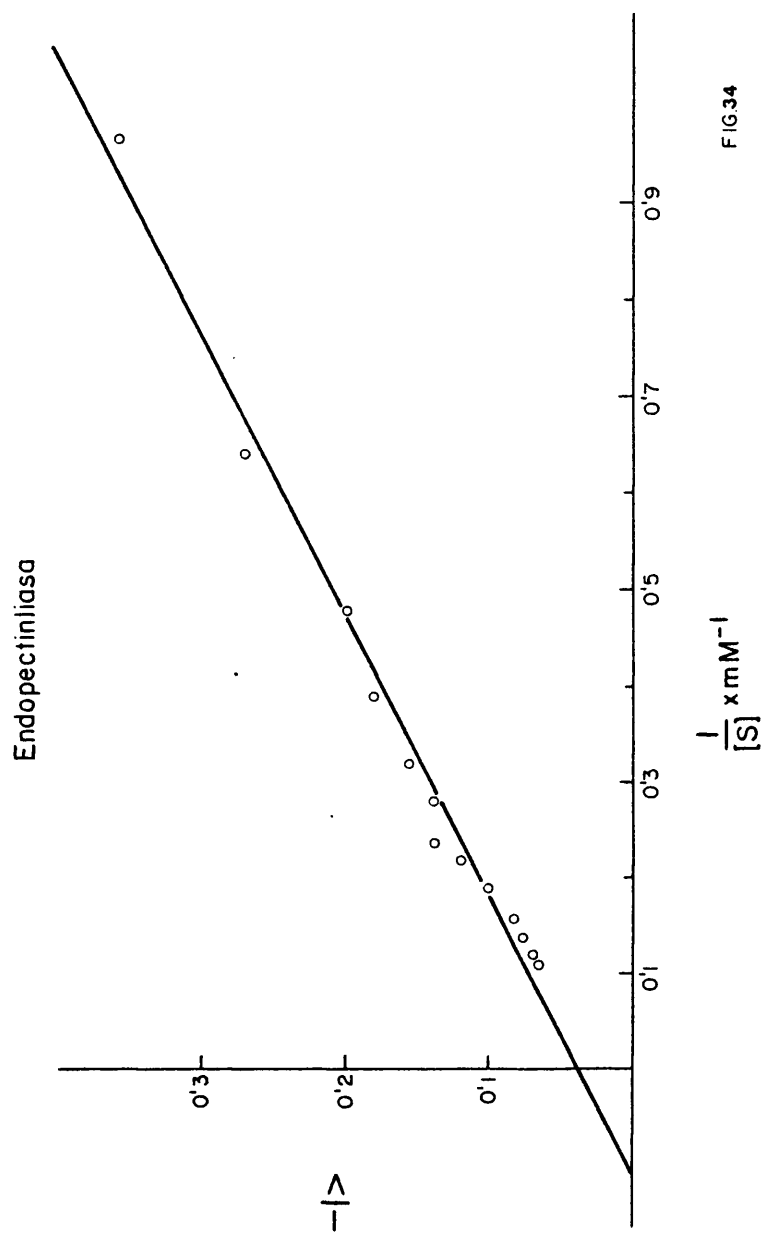


FIG.34

Estudios sobre el inhibidor de las Pectinliasas.-

- 1) El tampón en que se efectuó la dialisis se concentró en proporción 10:1, en un rotavapor "BUCHI", a la temperatura de 30°C.

En este líquido concentrado, debe encontrarse el inhibidor de las Pectinliasas.

Para demostrar esto, se incubaron los sustratos correspondientes con la solución de enzima dializada durante 5 horas. Este experimento se hizo por duplicado poniendo en uno de los casos 0,5 ml de líquido de la dialisis concentrado.

Los resultados obtenidos fueron:

| | actividad (U/ml) | |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| | <u>Enzima + sustrato</u> | <u>Enzima + sustrato + inhib.</u> |
| Exopectinliasa | 0,091 | 0,028 |
| Endopectinliasa | 16,935 | 7,142 |

A la vista de estos resultados, y viendo que en el caso en que ponemos el líquido de la dialisis concentrado, la actividad disminuye, se puede decir que en ese líquido se encuentra el inhibidor de estas enzimas.

- 2) Se intentó hacer una cromatografía con el líquido de la dialisis concentrado, extrayendo las sales con piridina, y el resultado fué que el inhibidor no se puede extraer con piridina. Esto se comprobó porque al incubar los sustratos correspondientes con solución de enzima dializada más el inhibidor extraído con piridina y llevado a sequedad, se obtenía la misma actividad que al incubar estos sustratos con la solución de enzima sin el inhibidor.

PECTINESTERASApH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana al 0,5% en ClNa 0,1 M, ajustado a diferentes valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 7 ml.

Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| pH | Lectura ml de NaOH 0,01N.factor | Actividad específica (U/mg) |
|-----|------------------------------------|---------------------------------|
| 3,0 | 0,000 | 0,00 |
| 4,0 | 0,042 | 0,84 |
| 5,0 | 0,367 | 7,34 |
| 5,5 | 0,630 | 12,20 |
| 6,0 | 0,472 | 9,44 |
| 7,0 | 0,021 | 4,20 |
| 8,0 | 0,000 | 0,00 |

El pH óptimo obtenido fué de 5,5 unidades. Los resultados se encuentran en la gráfica de la Fig 35 . El factor de la NaOH 0,01N utilizada fué de 1,05.

Variación de la actividad enzimática con la concentración de enzima.-

Sustrato: Pectina de manzana al 0,5% en ClNa 0,1 m, ajustado a un pH de 5,5 con NaOH 0,01 N, de factor 1,05.

Volumen de solución de enzima: de 0,5 a 5 ml.

Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzima.

Pectinesterasa

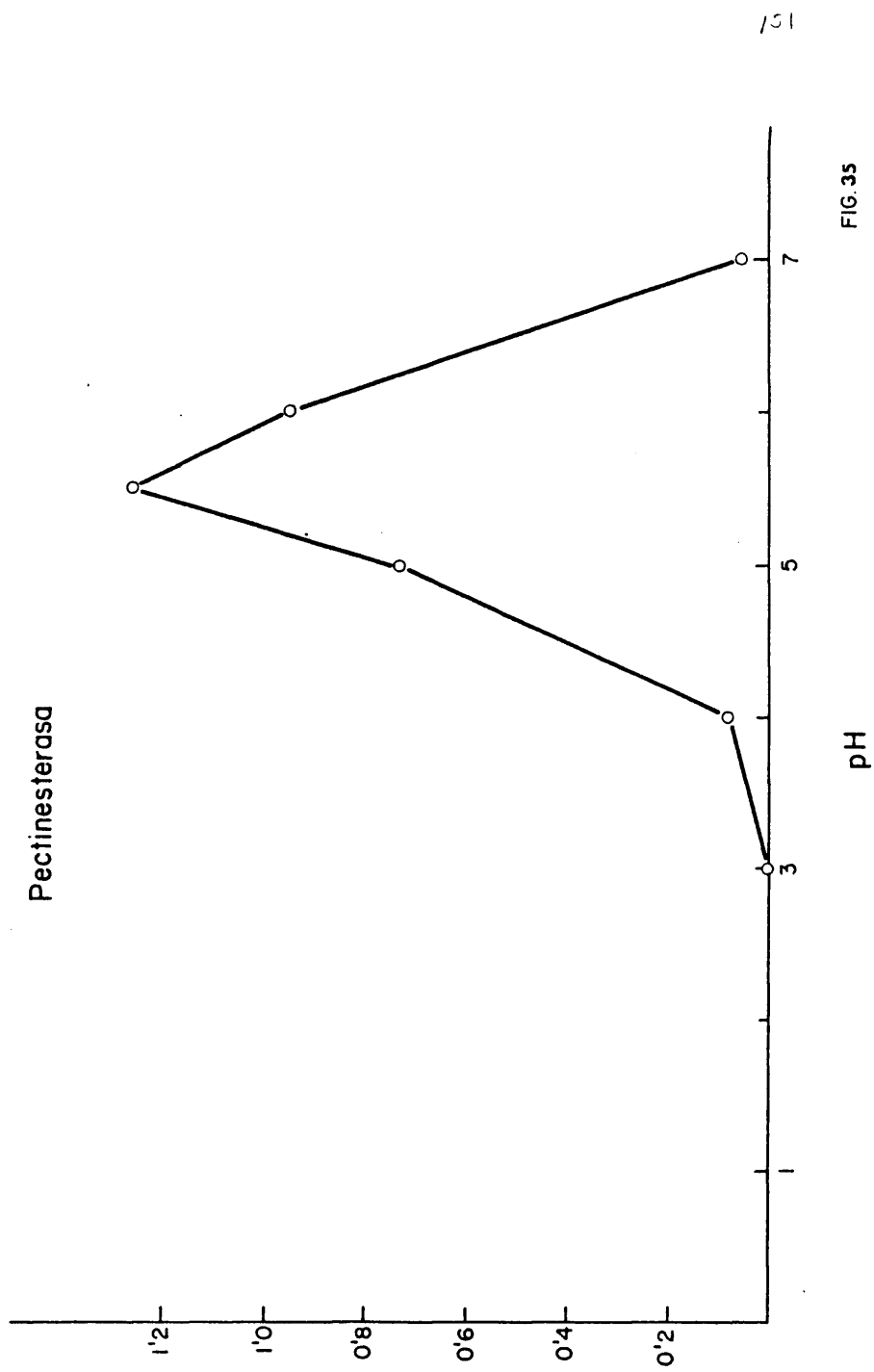


FIG. 35

Los resultados obtenidos fueron:

| <u>Volumen de solución de enzima (ml)</u> | <u>Lectura ml NaOH 0,01N.factor</u> | <u>Act.especifica (U/mg)</u> |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|
| 0,5 | 0,063 | 0,16 |
| 1,0 | 0,189 | 0,48 |
| 1,5 | 0,294 | 0,75 |
| 2,0 | 0,420 | 1,07 |
| 2,5 | 0,504 | 1,30 |
| 3,0 | 0,630 | 1,61 |
| 3,5 | 0,703 | 1,80 |
| 4,0 | 0,787 | 2,01 |
| 4,5 | 0,829 | 2,12 |
| 5,0 | 0,861 | 2,27 |

Los resultados obtenidos, se representan en la -
gráfica de la Fig. 36.

De esta gráfica podemos deducir, que a medida que
aumenta la concentración de enzima, aumenta la actividad en-
zimática.

Determinación de la $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima) y K_m (constante
de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Pectina de manzana, a concentraciones finales de
100 a 1800 mg/l (Referido a equivalentes de ácido
galacturónico, estas concentraciones van de 0,51
a 9,27 mM), en ClNa 0,1 M ajustado a un pH de 5,5
con NaOH 0,01 N de factor 1,05.

Volumen de solución de enzima: 14 ml.

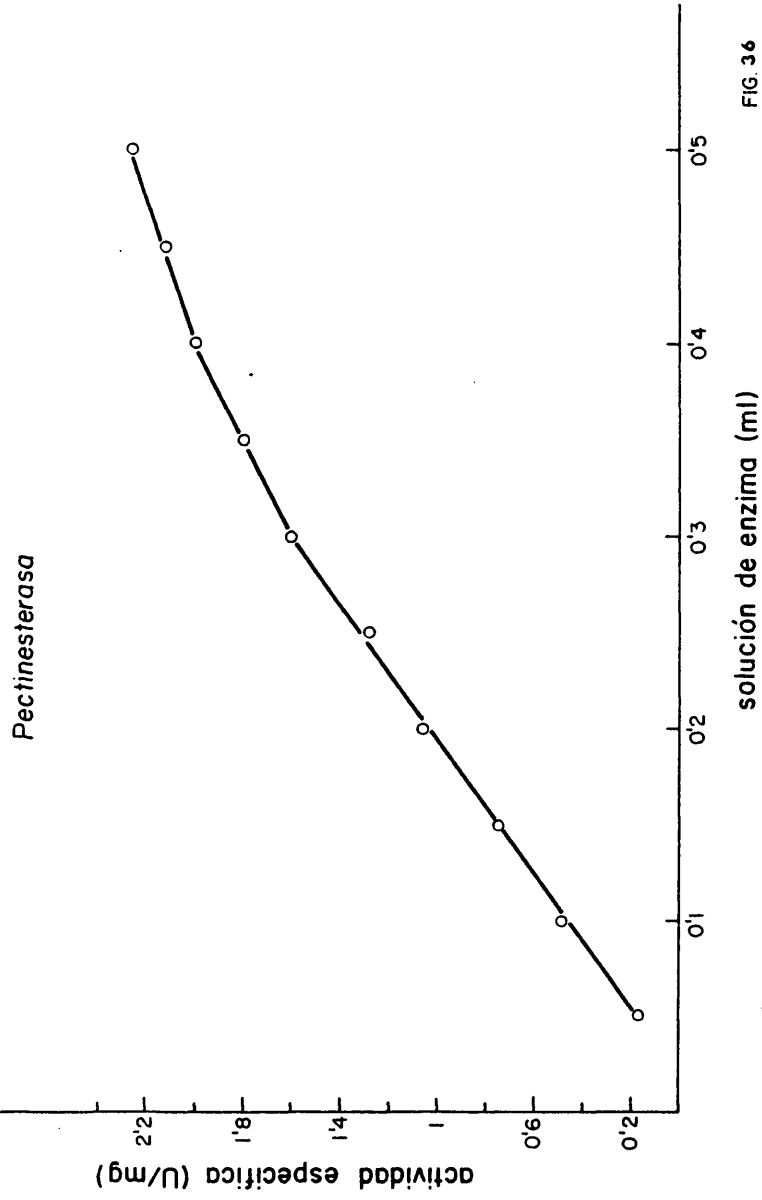


FIG. 36

Proteínas: 0,780 mg/ml de solución de enzima.

Tiempo de incubación: 5 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Concentraciones de sustrato (mM) | 1/[S] mM ⁻¹ | Lectura ml NaOH 0,01N.f | Actividad (U/ml) | (1/V) 1/U/ml |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------|
| 0,51 | 1,96 | 0,021 | 0,04 | 23,80 |
| 1,03 | 0,97 | 0,063 | 0,13 | 7,93 |
| 1,54 | 0,64 | 0,094 | 0,19 | 5,32 |
| 2,06 | 0,48 | 0,125 | 0,25 | 4,00 |
| 2,57 | 0,39 | 0,138 | 0,27 | 3,70 |
| 3,09 | 0,32 | 0,168 | 0,34 | 2,94 |
| 3,60 | 0,28 | 0,189 | 0,38 | 2,92 |
| 4,12 | 0,24 | 0,199 | 0,40 | 2,50 |
| 4,63 | 0,22 | 0,210 | 0,42 | 2,38 |
| 5,15 | 0,19 | 0,217 | 0,43 | 2,32 |
| 6,18 | 0,16 | 0,227 | 0,45 | 2,22 |
| 7,21 | 0,14 | 0,270 | 0,54 | 1,85 |
| 8,24 | 0,12 | 0,277 | 0,55 | 1,81 |
| 9,27 | 0,11 | 0,285 | 0,57 | 1,75 |

Representando estos valores en la gráfica de la Fig.37 , se obtienen los resultados:

$$-0,12 = - \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 8,33 \text{ mM}$$

$$V_{\max.} = \frac{1}{0,9} = 1,11 \text{ U/ml.}$$

Pectinesterase

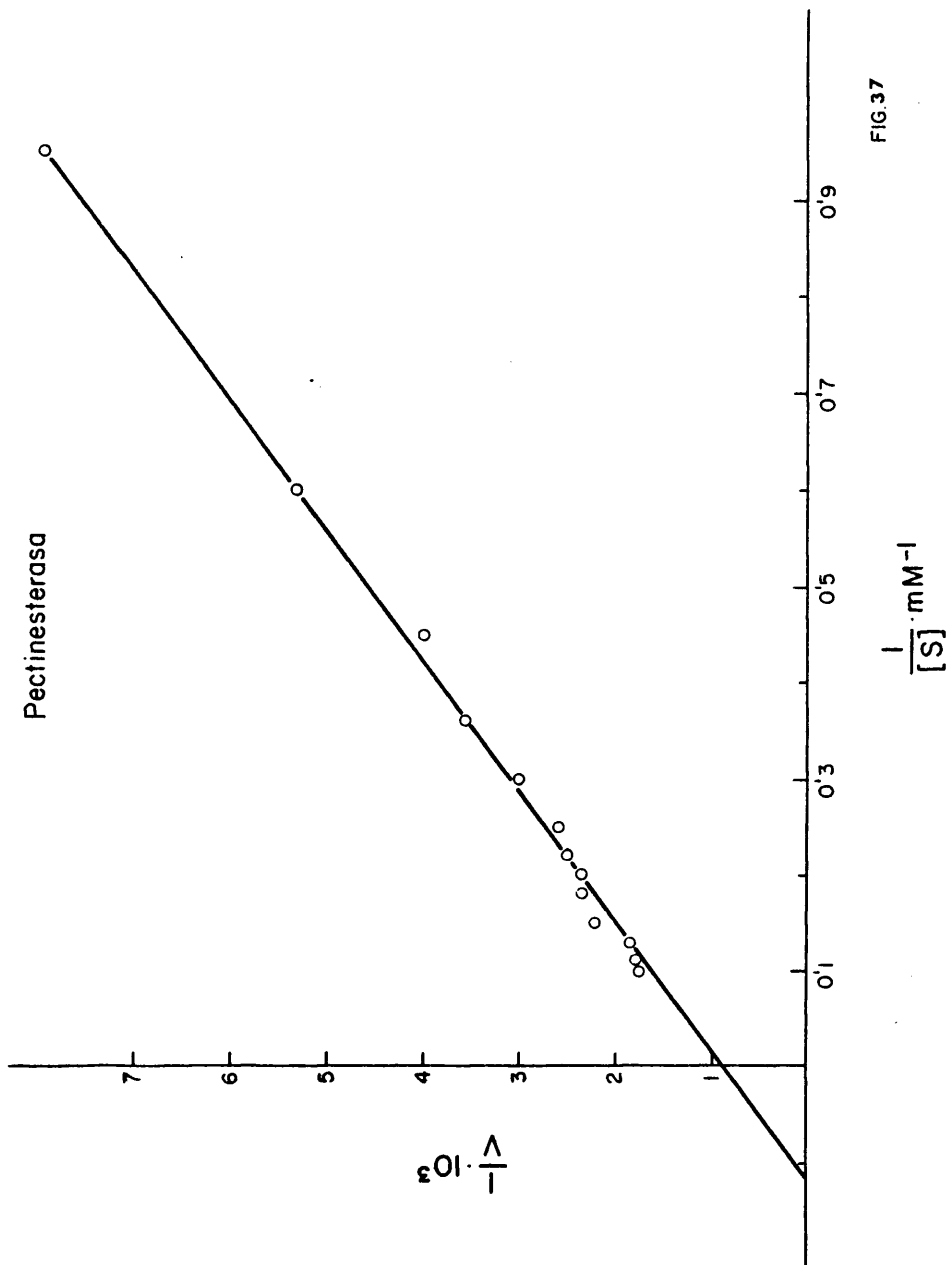


FIG. 37

XILANASApH óptimo de la actuación del enzima.-

Sustrato: Xilano coloidal a concentración final de 8 $\mu\text{g/ml}$,
 en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de diferen-
 tes valores de pH.

Volumen de solución de enzima: 140 μl .

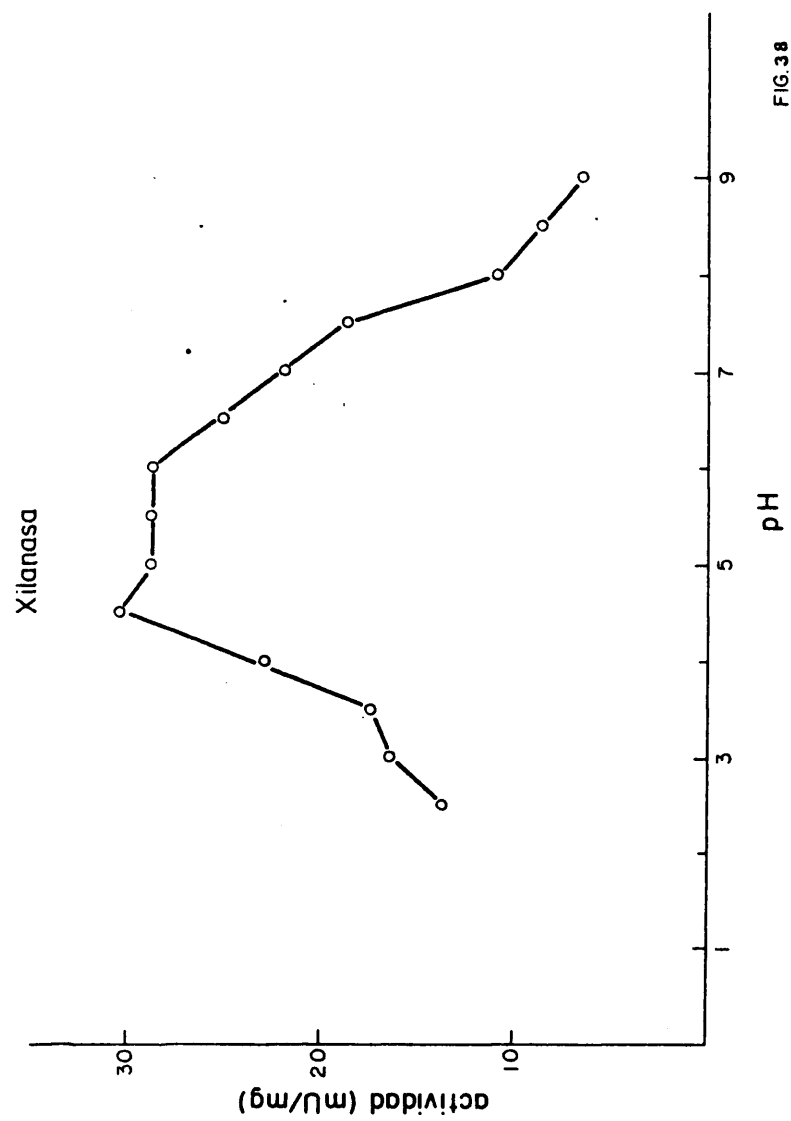
Proteínas: 0,680 mg/ml de la solución de enzima.

Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| pH | Lectura U.A. | Actividad específica (mU/mg) |
|-----|-----------------|---------------------------------|
| 2,5 | 0,15 | 13,88 |
| 3,0 | 0,18 | 16,66 |
| 3,5 | 0,19 | 17,59 |
| 4,0 | 0,25 | 23,14 |
| 4,5 | 0,33 | 30,55 |
| 5,0 | 0,32 | 29,62 |
| 5,5 | 0,32 | 29,62 |
| 6,0 | 0,32 | 29,62 |
| 6,5 | 0,27 | 25,00 |
| 7,0 | 0,24 | 22,22 |
| 7,5 | 0,20 | 18,51 |
| 8,0 | 0,12 | 11,11 |
| 8,5 | 0,09 | 8,33 |
| 9,0 | 0,07 | 6,48 |

El pH óptimo obtenido fué de 4,5. Los resultados se encuentran representados en la gráfica de la Fig. 38 .



Variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima.-

Sustrato: Xilano coloidal, a concentración final de 8 $\mu\text{g/ml}$,
en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,5.

Volumen de solución de enzima: de 5 a 60 μl .

Proteínas: 0,630 mg/ml de la solución de enzima.

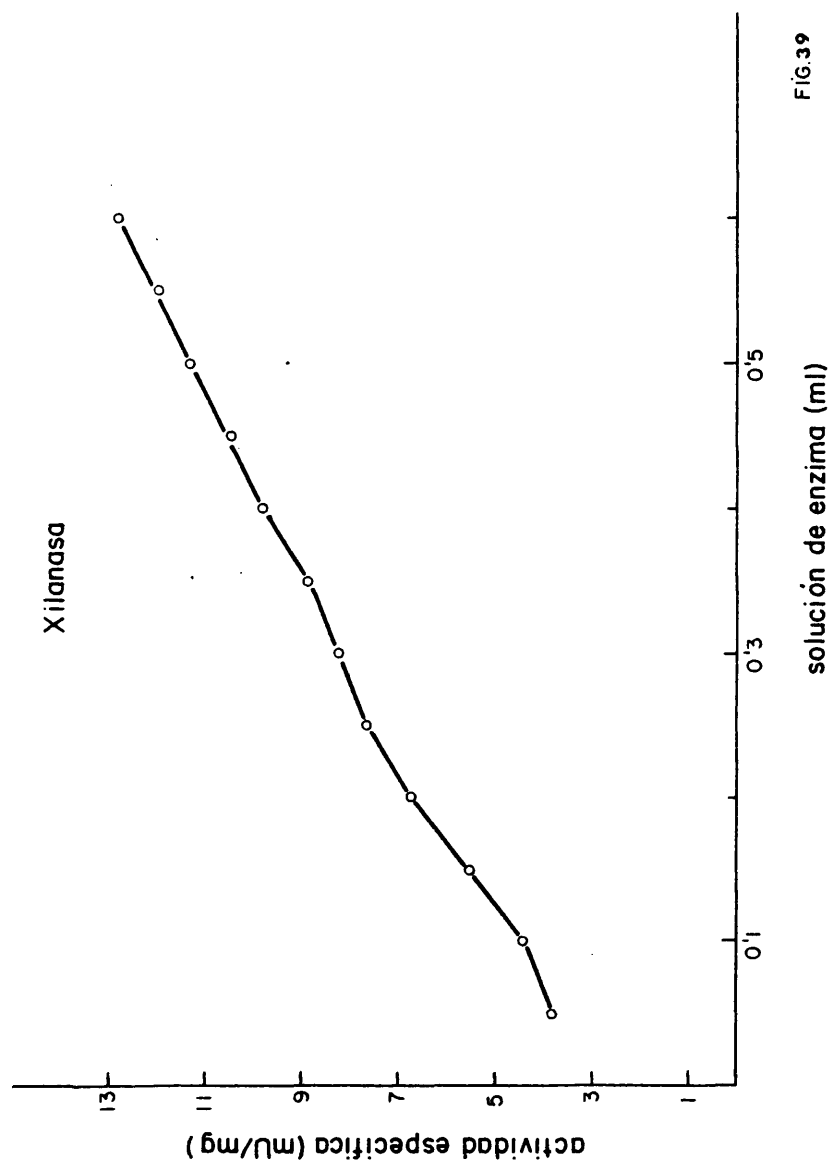
Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| <u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u> | <u>Lectura U.A.</u> | <u>Act.específica (mU/mg)</u> |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 5 | 0,12 | 3,82 |
| 10 | 0,14 | 4,42 |
| 15 | 0,18 | 5,50 |
| 20 | 0,22 | 6,73 |
| 25 | 0,25 | 7,65 |
| 30 | 0,27 | 8,25 |
| 35 | 0,29 | 8,87 |
| 40 | 0,32 | 9,79 |
| 45 | 0,34 | 10,40 |
| 50 | 0,37 | 11,32 |
| 55 | 0,39 | 11,94 |
| 60 | 0,42 | 12,86 |

Los resultados obtenidos, se encuentran representados en la gráfica de la Fig. 39 .

De esta gráfica podemos deducir, que a medida que aumenta la concentración de enzima, aumenta la actividad enzimática.



Determinación de la $V_{\text{máx}}$ (velocidad máxima) y K_m (constante de Michaelis-Menten) por el método de Lineweaver-Burk.-

Sustrato: Xilano coloidal, a concentraciones finales de 0,80 a 14,40 $\mu\text{g/ml}$ (Referido a equivalentes de xilosa, estas concentraciones van de 0,005 a 0,096 mM), en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M de pH 4,5.

Volumen de solución de enzima: 140 μl .

Proteínas: 0,630 mg/ml de la solución de enzima.

Tiempo de incubación: 2 horas.

Los resultados obtenidos fueron:

| Concentraciones se sustrato(mM) | $1/[S]$ mM^{-1} | Lectura U.A. | Actividad mU/ml | $(1/V) \cdot 10^3$ $1/\text{U/ml}$ |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| 0,005 | 200,0 | 0,04 | 9,2 | 108,6 |
| 0,010 | 100,0 | 0,10 | 23,1 | 43,2 |
| 0,016 | 62,5 | 0,15 | 35,1 | 28,5 |
| 0,021 | 47,6 | 0,19 | 45,4 | 22,0 |
| 0,027 | 37,0 | 0,27 | 53,4 | 18,7 |
| 0,032 | 31,2 | 0,24 | 57,1 | 17,5 |
| 0,037 | 27,0 | 0,27 | 62,5 | 16,0 |
| 0,043 | 23,2 | 0,29 | 67,1 | 13,9 |
| 0,048 | 20,8 | 0,34 | 80,0 | 12,5 |
| 0,053 | 18,9 | 0,39 | 90,2 | 11,0 |
| 0,064 | 15,6 | 0,44 | 101,8 | 9,8 |
| 0,075 | 13,3 | 0,49 | 113,4 | 8,8 |
| 0,085 | 11,8 | 0,50 | 115,7 | 8,6 |
| 0,096 | 10,4 | 0,52 | 120,3 | 8,3 |

Representando estos resultados en la gráfica de la Fig. 40 , se obtienen los valores:

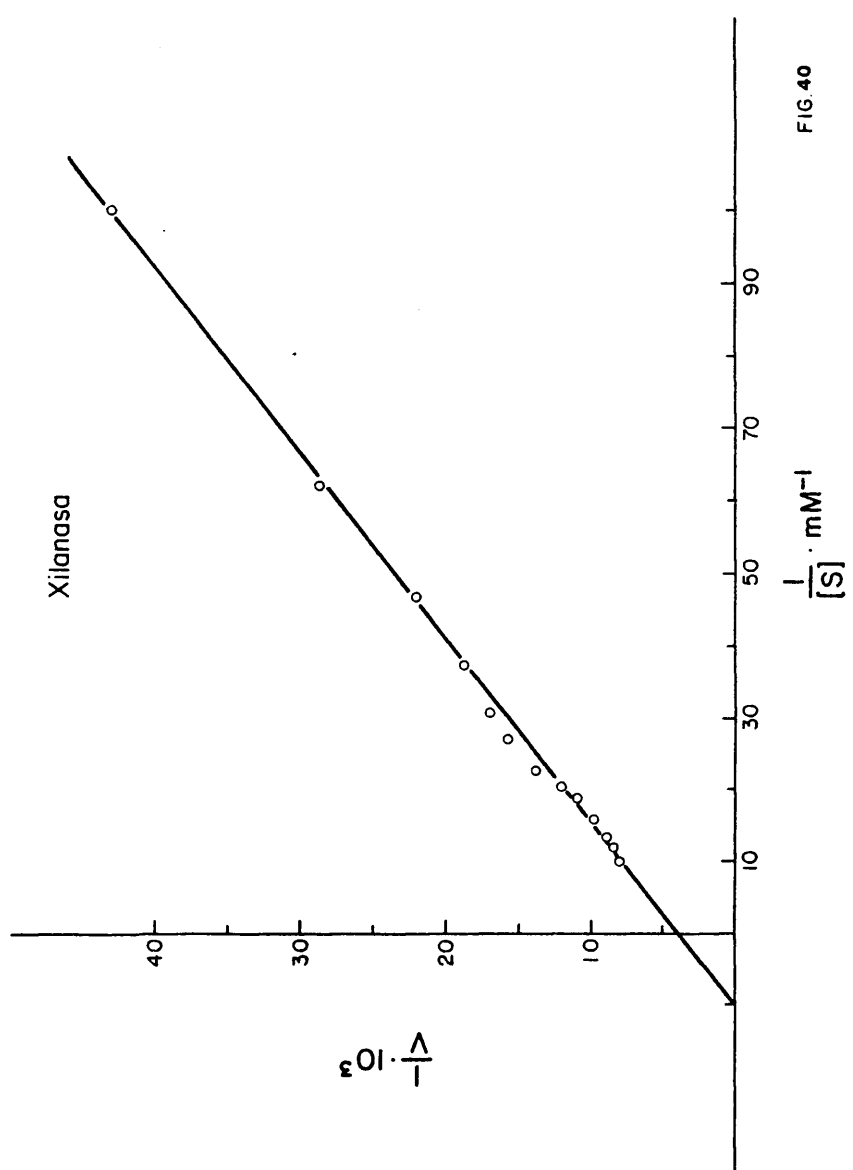


FIG. 40

$$-10 = -\frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 0,10 \text{ mM.}$$

$$V_{\text{máx}} = \frac{1}{4} = 0,25 \text{ U/ml} = 250 \text{ mU/ml.}$$

ENZIMAS PROTEOLITICOS

Se investigó por el método de las placas de agar-gelatina (cualitativamente) sin detectarse actividad enzimática. Para este experimento se utilizaron enzimas parcialmente purificadas, de 45, 80, 90 y 115 días.

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DÚRANTE LA AUTOLISIS DE BOTRYTIS
CINEREA

Variación de la actividad enzimática de la β -N-acetilglucosaminidasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos a partir de las valoraciones realizadas en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio, descritas en el apartado de "Materiales y Métodos", se hayan agrupados en la Tabla I.

En la representación gráfica, se tomó en abscisas el periodo de incubación, expresado en días, y en ordenadas la actividad enzimática, expresada en mg/muestra.(Fig.41). La curva cuyos puntos estan representados por el signo \circ corresponde a la variación en el líquido de cultivo, y la curva corresponde al signo \bullet a la variación en el extracto de micelio.

En esta gráfica podemos observar que hasta los 20 días de incubación, esta enzima aumenta en el extracto de micelio, y que cuando en este empieza a disminuir hay un gran aumento en la liberación de esta enzima al líquido de cultivo.

Variación de la actividad enzimática de la quitinasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos a partir de las valoraciones realizadas en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio, se han agrupado en la Tabla II.

TABLA I

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA β -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA DURANTE LA AUTOLISIS.

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 52,0 | 654,0 | 8,9 | 96,6 |
| 6 | 330,0 | 708,0 | 47,1 | 90,2 |
| 7 | 450,0 | 736,0 | 51,1 | 107,5 |
| 12 | 420,0 | 1144,0 | 47,2 | 146,6 |
| 20 | 660,0 | 1332,0 | 59,5 | 375,0 |
| 26 | 1920,0 | 1080,0 | 176,1 | 544,1 |
| 33 | 1790,0 | 546,0 | 168,9 | 357,6 |
| 40 | 1740,0 | 432,0 | 165,7 | 316,9 |
| 47 | 1900,0 | 225,0 | 190,0 | 181,2 |
| 54 | 1860,0 | 228,0 | 175,5 | 247,0 |
| 61 | 1840,0 | 258,0 | 175,2 | 296,6 |
| 69 | 1840,0 | 240,0 | 175,2 | 262,7 |
| 76 | 1840,0 | 245,0 | 204,4 | 281,6 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

β -N-acetylglucosaminidasa

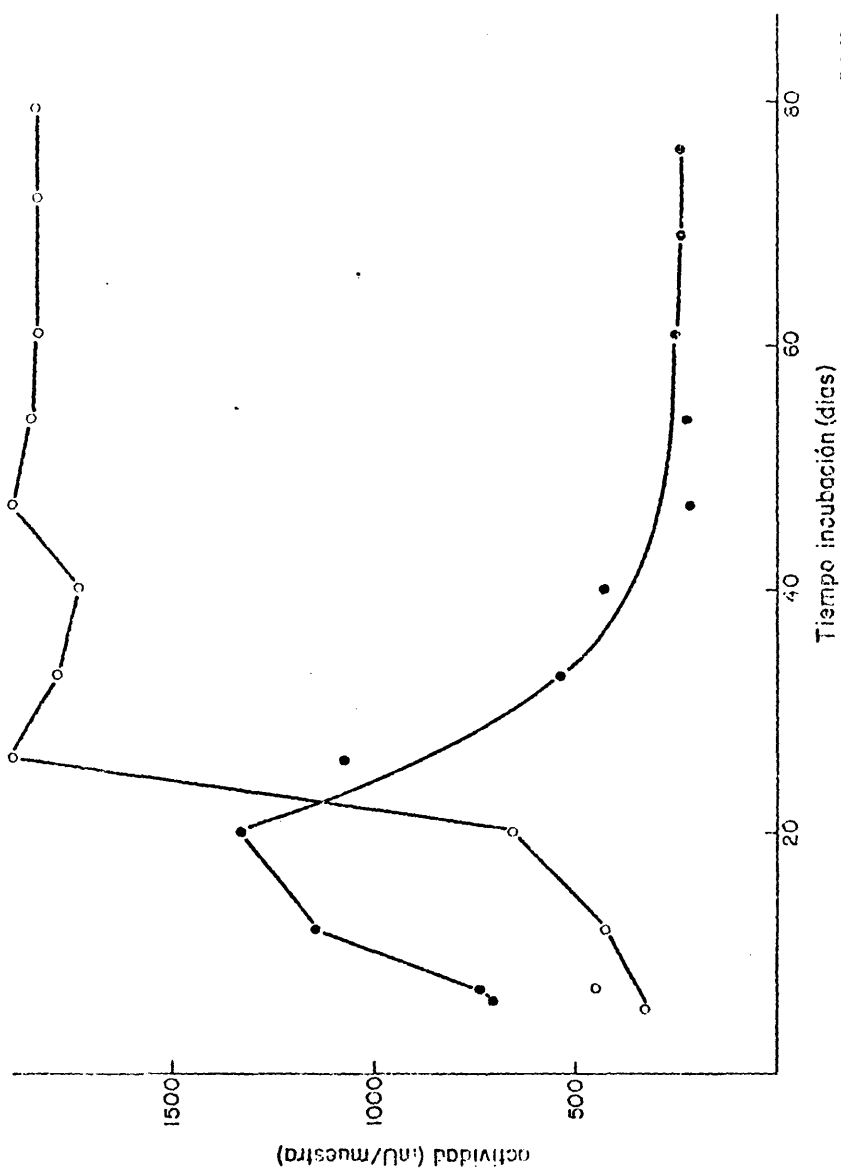


FIG. 41

TABLA II

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA QUITINASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 0,8 | 1,4 | 0,1 | 0,1 |
| 7 | 1,0 | 2,1 | 0,1 | 0,3 |
| 12 | 2,2 | 1,4 | 0,3 | 0,2 |
| 21 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 35 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

Variación de la actividad de la Fosfatasa ácida durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos estudiando la Fosfatasa a pH 3,5, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio se hayan en la Tabla III.

Variación de la actividad enzimática de la Fosfatasa alcalina durante la autólisis.-

Estudiando la Fosfatasa a pH 9,5 se han obtenido para el líquido de cultivo y para el extracto de micelio los resultados que se hayan en la Tabla IV.

Variación de la actividad de la (1,3)- β -glucanasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para el líquido de cultivo y para el extracto de micelio se hayan agrupados en la Tabla V.

La representación gráfica se ha realizado llevando en abscisas el tiempo de incubación, expresado en días, y en ordenadas la actividad enzimática, expresada en MU por muestra. (Fig. 42).

En la Fig. 42 se ha representado con el signo \circ la curva que corresponde al líquido de cultivo, y con el signo \bullet la que corresponde al extracto de micelio.

Variación de la actividad enzimática de la invertasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio, se encuentran en la Tabla VI.

TABLA III

VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ACIDA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 70,0 | 568,0 | 10,0 | 72,4 |
| 7 | 50,0 | 400,0 | 5,7 | 58,4 |
| 12 | 0,0 | 174,0 | 0,0 | 22,3 |
| 21 | 0,0 | 78,0 | 0,0 | 21,9 |
| 35 | 0,0 | 36,0 | 0,0 | 18,1 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

TABLA IV

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FOSFATASA ALCALINA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 0,0 | 20,0 | 0,0 | 2,5 |
| 7 | 0,0 | 12,0 | 0,0 | 1,7 |
| 12 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 21 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 35 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

TABLA V

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA (1,3)- β -GLUCANASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | 0,0 | 315,6 | 0,0 | 40,2 |
| 7 | 2104,0 | 1315,7 | 239,1 | 192,2 |
| 12 | 6368,0 | 1381,5 | 827,9 | 177,1 |
| 20 | 13510,0 | 1297,0 | 1217,1 | 365,1 |
| 26 | 12570,0 | 681,0 | 1153,2 | 343,1 |
| 33 | 14380,0 | 750,0 | 1356,6 | 491,2 |
| 40 | 14558,0 | 318,0 | 1386,5 | 233,3 |
| 47 | 14516,0 | 387,0 | 1451,6 | 311,6 |
| 54 | 15200,0 | 274,0 | 1483,9 | 296,9 |
| 61 | 13540,0 | 249,9 | 1289,5 | 287,2 |
| 69 | 13280,0 | 242,7 | 1264,8 | 275,8 |
| 76 | 13400,0 | 250,1 | 1488,9 | 287,5 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

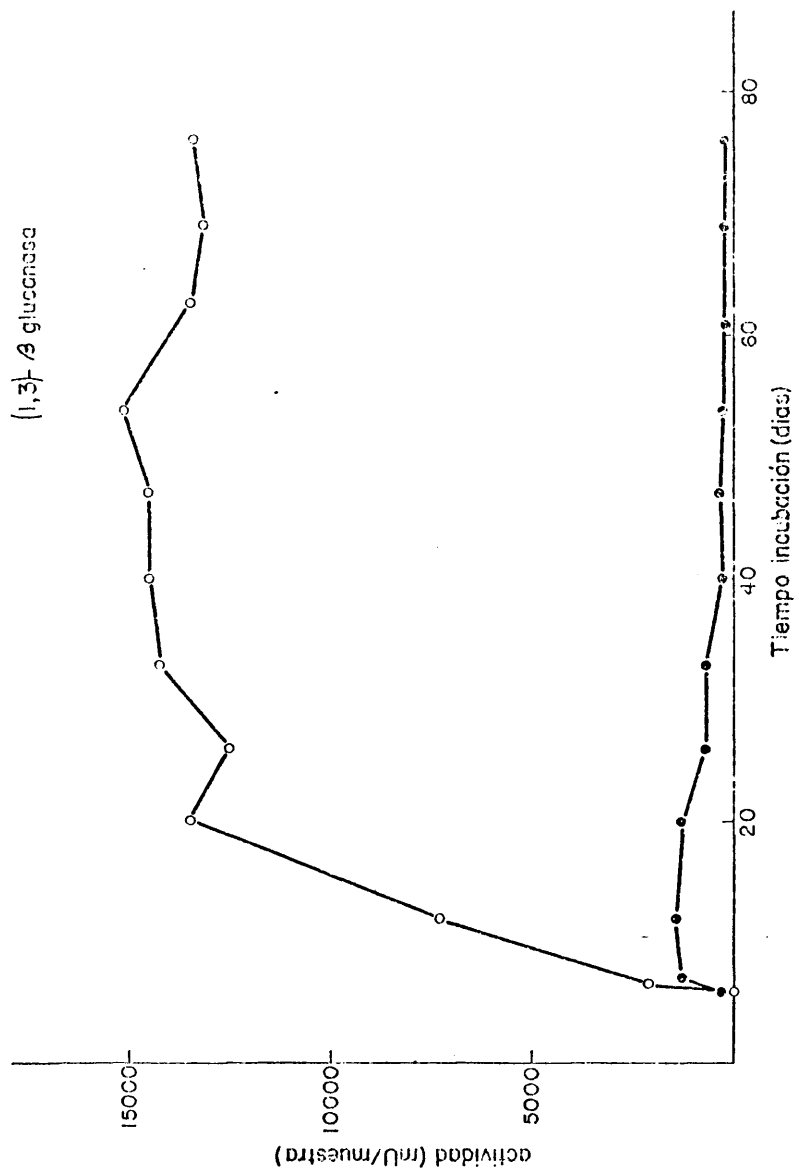


FIG. 42

TABLA VI

| VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA INVERTASA DURANTE LA AUTOLISIS | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|------------|--------|--------------------|--------|
| Tiempo de incubación (días) | | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
| | | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | - | - | - | - |
| 6 | 142,4 | 236,8 | | 24,4 | 30,2 |
| 7 | 920,5 | 368,4 | | 128,5 | 53,9 |
| 12 | 0,0 | 0,0 | | 0,0 | 0,0 |
| 21 | 0,0 | 0,0 | | 0,0 | 0,0 |
| 35 | 0,0 | 0,0 | | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

Variación de la actividad enzimática de la celulasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para el líquido de cultivo y el extracto de micelio se han agrupado en la Tabla VII.

Variación de la actividad enzimática de la α -amilasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio, se han en la Tabla VIII.

La representación gráfica (Fig.43) se ha realizado llevando en abscisas el tiempo de incubación, expresado en días, y en ordenadas, la actividad enzimática, expresada en MU/muestra.

En la Fig. 23 podemos observar la curva que pertenece a la variación de la actividad en el líquido de cultivo con el signo \circ , y la que pertenece a la variación en el extracto de micelio con el signo \bullet .

Variación de la actividad de la (1,6)- β -glucanasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos durante este periodo, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio, los hemos agrupado en la Tabla IX.

Variación de la actividad enzimática de la (1,4)(1,3)- β -glucanasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para el líquido de cultivo y para el extracto de micelio se han representado en la

TABLA VII

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA CELULASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | 0,0 | 315,0 | 0,0 | 46,1 |
| 12 | 656,0 | 0,0 | 74,5 | 0,0 |
| 21 | 784,0 | 0,0 | 70,6 | 0,0 |
| 35 | - | 0,0 | - | 0,0 |
| 43 | 480,0 | 0,0 | 45,7 | 0,0 |
| 50 | - | 0,0 | - | 0,0 |
| 63 | 340,0 | 0,0 | 32,5 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

TABLA VIII

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA α -AMILASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 1260,0 | 122,0 | 217,2 | 18,0 |
| 6 | 4934,0 | 394,6 | 704,9 | 50,3 |
| 7 | 5932,0 | 710,5 | 674,1 | 103,8 |
| 12 | 5802,0 | 236,8 | 651,9 | 30,8 |
| 20 | 6714,0 | 0,0 | 604,9 | 0,0 |
| 26 | 4704,0 | 0,0 | 431,6 | 0,0 |
| 33 | 1282,0 | 0,0 | 120,9 | 0,0 |
| 40 | 808,0 | 0,0 | 76,9 | 0,0 |
| 47 | 644,0 | 0,0 | 64,4 | 0,0 |
| 54 | 780,0 | 0,0 | 73,6 | 0,0 |
| 61 | 762,0 | 0,0 | 72,6 | 0,0 |
| 69 | 660,0 | 0,0 | 62,9 | 0,0 |
| 76 | 700,0 | 0,0 | 77,8 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

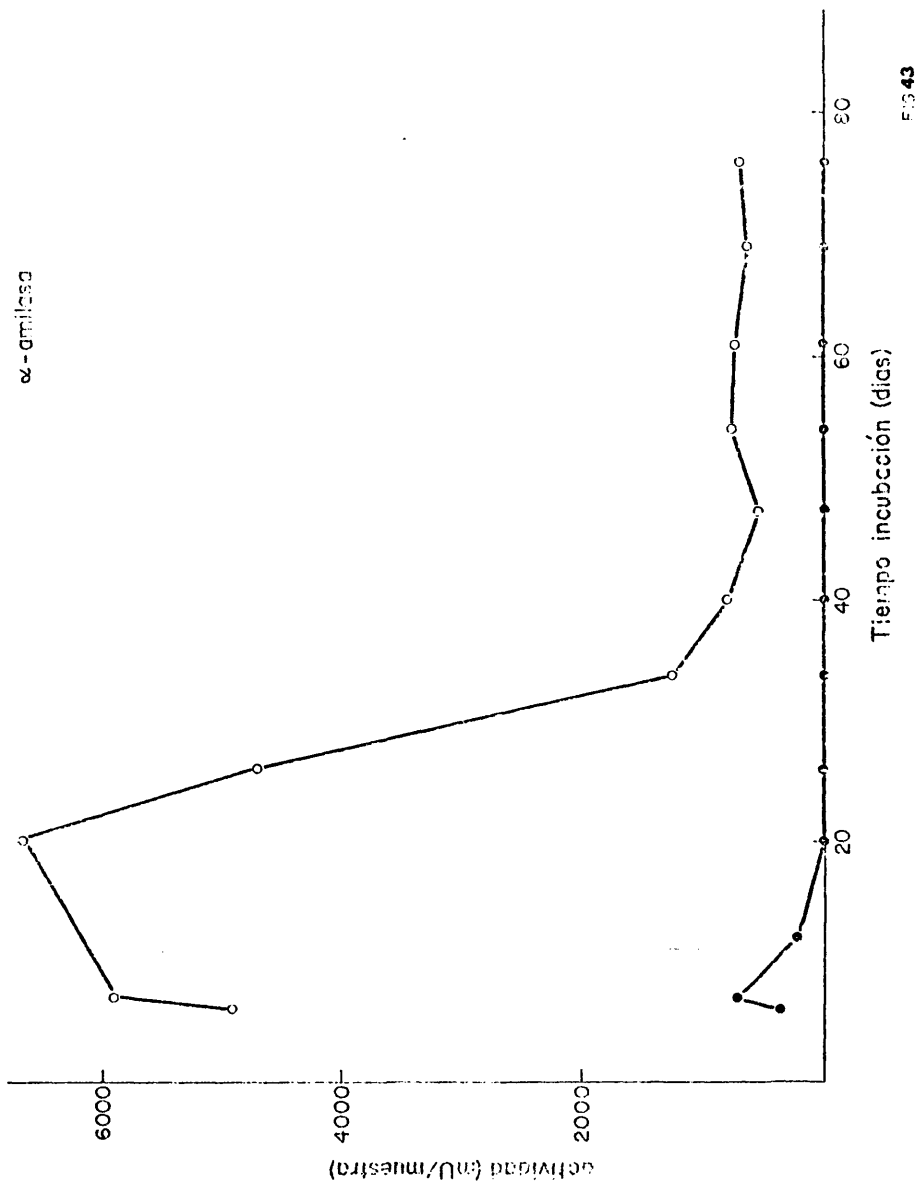


Fig. 43

TABLA IX

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA (1,6)- β -GLUCANASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | 0,0 | 736,8 | 0,0 | 107,6 |
| 12 | 788,0 | 0,0 | 88,5 | 0,0 |
| 21 | 400,0 | 0,0 | 36,6 | 0,0 |
| 35 | - | 0,0 | - | 0,0 |
| 43 | 214,0 | 0,0 | 21,4 | 0,0 |
| 50 | 78,0 | 0,0 | 7,3 | 0,0 |
| 63 | 68,0 | 0,0 | 6,4 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

Tabla X.

Variación de la actividad enzimática de la Dextranasa durante la autólisis.-

La actividad de esta enzima no se representa en ninguna Tabla, debido a que en todo el proceso autolítico no se ha detectado ni en el líquido de cultivo ni en el extracto de micelio.

Variación de la actividad enzimática de la Poligalacturonasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para esta enzima, tanto para el líquido de cultivo, como para el extracto de micelio, se hayan en la Tabla XI.

La representación gráfica (Fig. 44) se ha realizado llevando en abscisas el tiempo de incubación (días) y en ordenadas la actividad enzimática (mU/muestra).

En la Fig. 44, la curva que se señala con el símbolo \circ pertenece al líquido de cultivo, y la del signo \bullet al extracto de micelio.

Variación de la actividad Polimetilgalacturonasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para el líquido de cultivo y para el extracto de micelio se encuentran en la Tabla XII.

La representación gráfica (Fig. 45) se ha realizado llevando en abscisas el tiempo de incubación, expresado en días, y en ordenadas la actividad enzimática, expresada

TABLA X

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA (1, 4) (1, 3)- β -GLUCANASA DURANTE LA AUTOLISIS.

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | - | 0,0 | - | 0,0 |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | 262,0 | 0,0 | 29,7 | 0,0 |
| 21 | 356,0 | 0,0 | 32,1 | 0,0 |
| 35 | 940,0 | 0,0 | 89,5 | 0,0 |
| 43 | 886,0 | 0,0 | 88,6 | 0,0 |
| 50 | 780,0 | 0,0 | 73,6 | 0,0 |
| 63 | 762,0 | 0,0 | 72,6 | 0,0 |

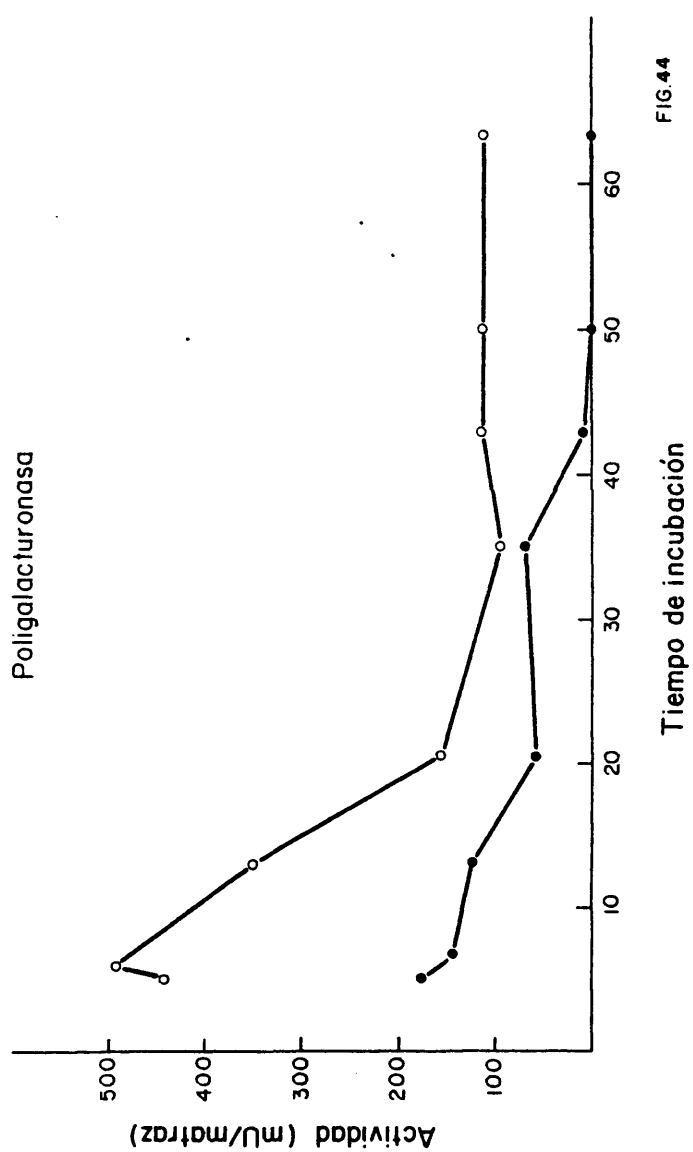
Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

TABLA XI

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIGALACTURONANASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 438,0 | 166,6 | 75,5 | 24,6 |
| 6 | 486,0 | 145,8 | 69,4 | 18,5 |
| 13 | 346,0 | 118,0 | 38,0 | 14,9 |
| 21 | 138,0 | 62,5 | 12,2 | 16,9 |
| 35 | 92,0 | 69,4 | 8,8 | 43,3 |
| 43 | 114,0 | 6,9 | 10,7 | 5,7 |
| 50 | 114,0 | 0,0 | 10,7 | 0,0 |
| 63 | 114,0 | 0,0 | 10,8 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.



en mU/muestra.

La curva de la Fig. 45 señalada con el signo \circ corresponde al líquido de cultivo, y la señalada con el signo \bullet al extracto de micelio.

Variación de la actividad enzimática de la Exopectinlinasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio, se han agrupado en la Tabla XIII.

Hemos representado en la Fig. 46, la curva que pertenece al líquido de cultivo con el signo \circ , y la que pertenece al extracto de micelio con el signo \bullet . En abscisas tenemos el tiempo de incubación (días) y en ordenadas la actividad enzimática (mU/muestra).

La actividad de esta enzima se midió también incubando la enzima con el sustrato e iones de Ca^{++} , resultando ser la misma que cuando se incubaba sin los iones de Ca^{++} .

Variación de la actividad enzimática de la Endopectinlinasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos, tanto para el líquido de cultivo, como para el extracto de micelio, se encuentran en la Tabla XIV.

La representación gráfica (Fig. 47) se ha llevado a cabo colocando en abscisas el tiempo de incubación, expresado en días, y en ordenadas la actividad enzimática, expresada en mU/muestra.

TABLA XII

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIMETILGALACTURONANASA DURANTE LA AUTOLISIS.

| Tiempo de incubación (dias) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 185,0 | 270,0 | 31,9 | 39,9 |
| 6 | 231,0 | 69,0 | 33,1 | 8,8 |
| 13 | 555,5 | 69,0 | 61,0 | 8,7 |
| 21 | 1064,8 | 83,0 | 94,2 | 22,4 |
| 35 | 277,0 | 41,0 | 26,4 | 26,0 |
| 43 | 208,0 | 13,8 | 19,6 | 10,9 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

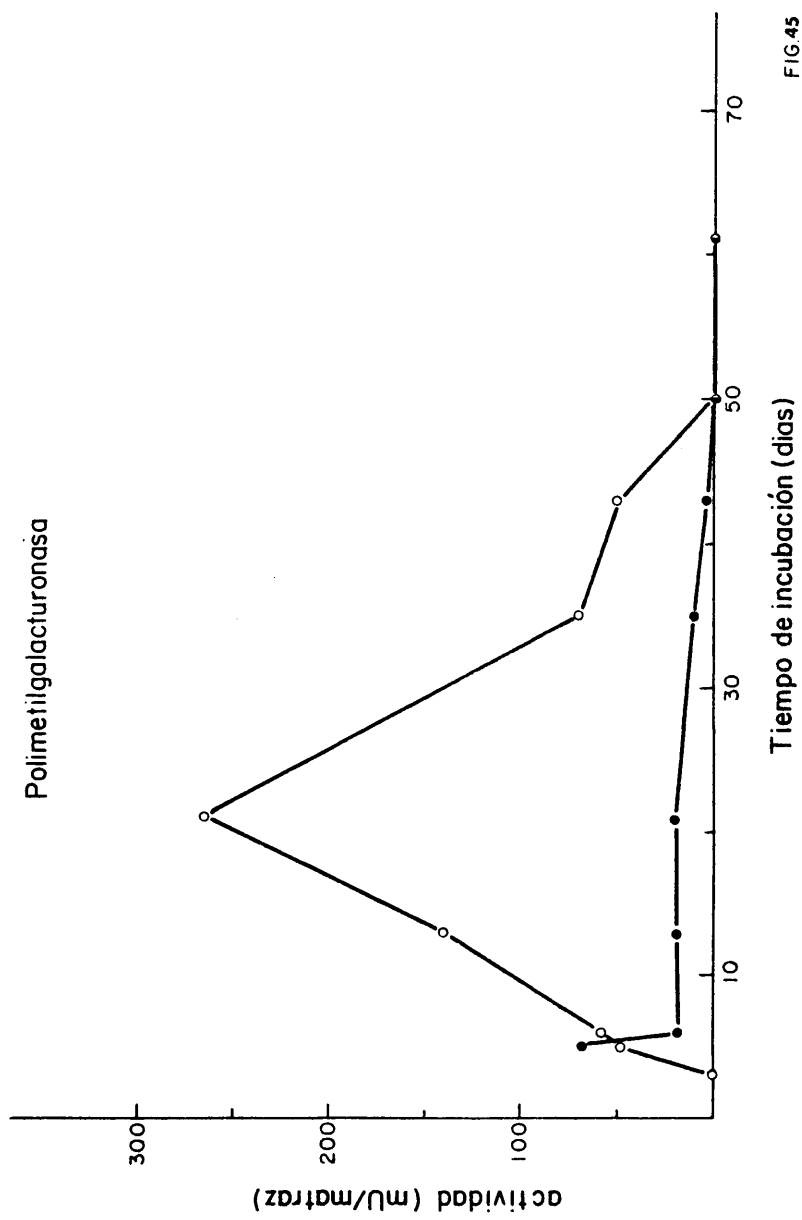


TABLA XIII

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA EXOPECTINLIASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 40,0 | 156,0 | 7,0 | 23,0 |
| 6 | 160,0 | 208,0 | 23,0 | 26,0 |
| 13 | 340,0 | 326,0 | 37,0 | 41,0 |
| 21 | 260,0 | 130,0 | 23,0 | 35,0 |
| 35 | 380,0 | 0,0 | 36,0 | 0,0 |
| 43 | 600,0 | 0,0 | 56,0 | 0,0 |
| 50 | 1600,0 | 0,0 | 150,0 | 0,0 |
| 63 | 1460,0 | 0,0 | 135,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos son la media de 3 experimentos.

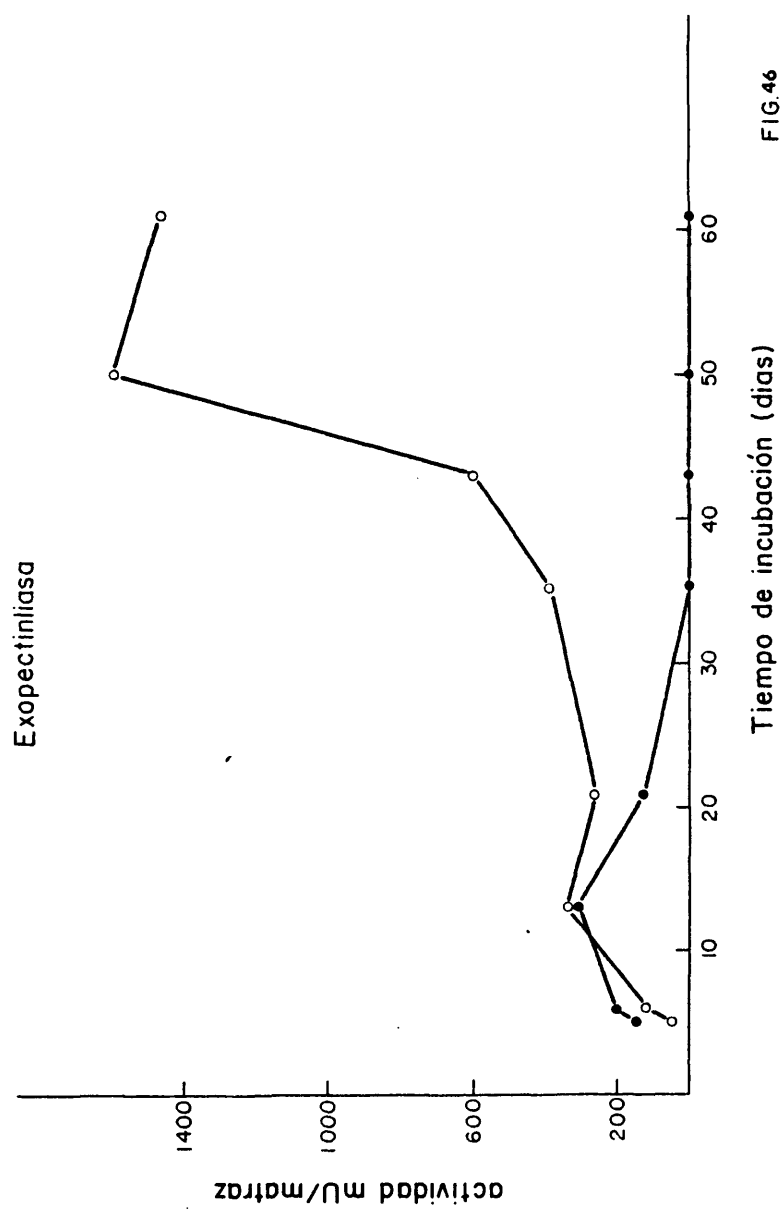


FIG. 46

TABLA XIV

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ENDOPECTINLIASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (dias) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 266,6 | 274,2 | 45,9 | 40,6 |
| 6 | 304,8 | 222,8 | 43,5 | 28,4 |
| 13 | 682,8 | 148,5 | 75,0 | 18,8 |
| 21 | 761,9 | 125,7 | 67,4 | 33,9 |
| 35 | 380,9 | 0,0 | 36,3 | 0,0 |
| 43 | 323,8 | 0,0 | 30,5 | 0,0 |
| 50 | 380,9 | 0,0 | 35,9 | 0,0 |
| 63 | 400,0 | 0,0 | 38,1 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

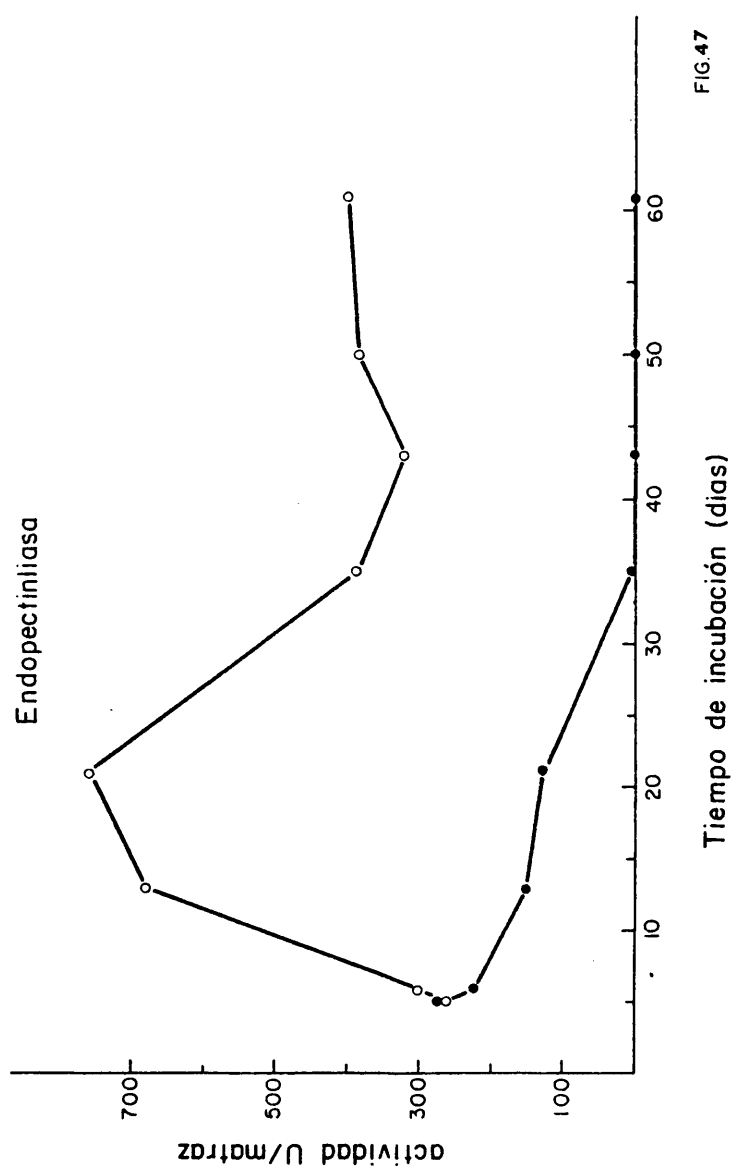


FIG.47

En la Fig. 47, la curva señalada con el signo \circ pertenece al líquido de cultivo, y la del signo \bullet al extracto de micelio.

Al probar si la actividad de esta enzima aumentaba al añadir en la incubación iones Ca^{++} , comprobamos que no variaba.

Variación de la actividad de la Exopectatoliasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio, se encuentran en la Tabla XV.

Al añadir iones Ca^{++} en el medio de incubación de esta enzima, comprobamos que su actividad enzimática no variaba.

Variación de la actividad enzimática de la Endopectatoliasa durante la autólisis.-

La actividad enzimática de esta enzima, tanto para el líquido de cultivo como para el extracto de micelio se encuentra en la Tabla XVI.

Comprobamos que la actividad enzimática no varia al añadir en el medio de incubación iones Ca^{++} .

Variación de la actividad enzimática de la Pectinesterasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para el líquido de cultivo y el extracto de micelio, se encuentran en la Tabla XVII.

TABLA XV

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA EXOPECTATOLIASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (dias) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 0,0 | 91,0 | 0,0 | 13,5 |
| 6 | 0,0 | 108,0 | 0,0 | 13,8 |
| 13 | 0,0 | 52,0 | 0,0 | 6,6 |
| 21 | 0,0 | 21,0 | 0,0 | 5,7 |
| 35 | 0,0 | 13,0 | 0,0 | 8,1 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

TABLA XVI

VALORACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ENDOPECTATOLIASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (dias) | U/muestra | | U/mg de proteínas | |
|--------------------------------|-----------|--------|-------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 0,0 | 19,7 | 0,0 | 2,9 |
| 6 | 0,0 | 19,5 | 0,0 | 2,4 |
| 13 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 21 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 35 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

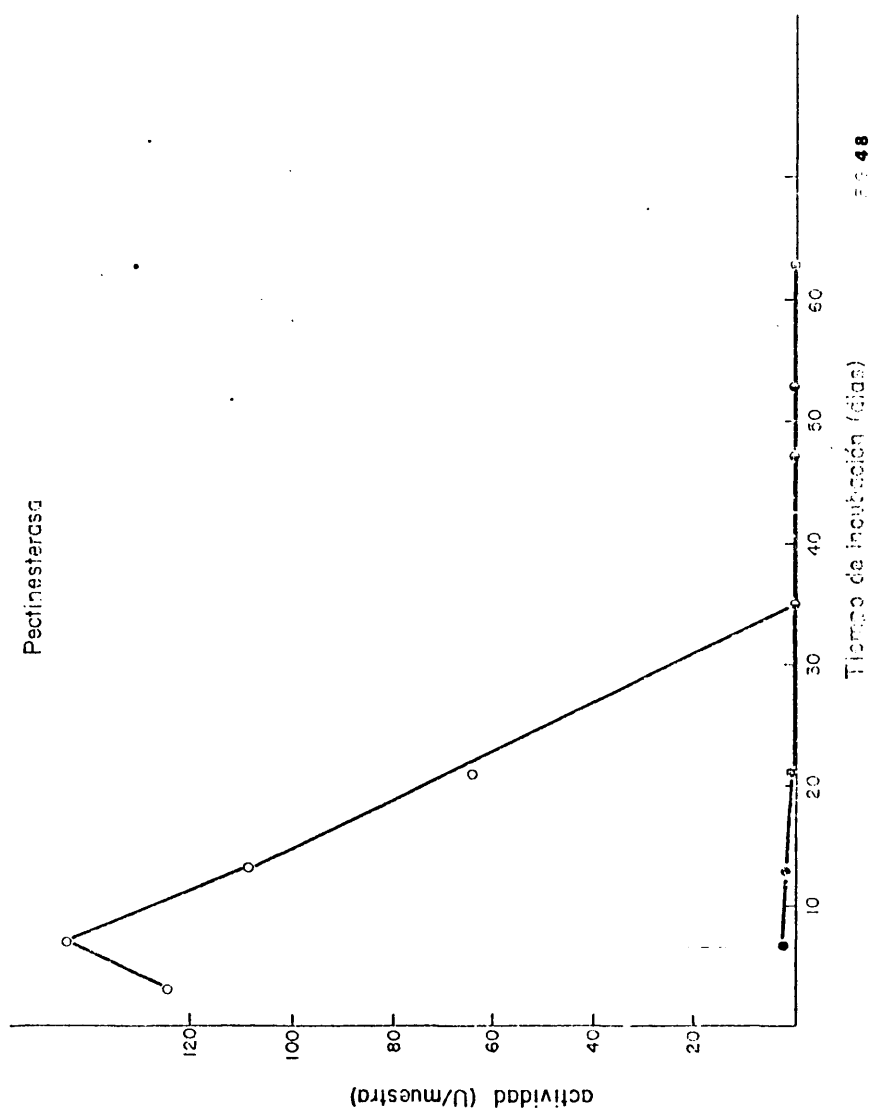
Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

TABLA XVII

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PECTINESTERASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (días) | U/muestra | | U/mg de proteínas | |
|--------------------------------|-----------|--------|-------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 620,0 | 12,6 | 106,9 | 1,9 |
| 6 | 720,0 | 10,2 | 102,9 | 1,3 |
| 13 | 540,0 | 9,0 | 59,3 | 1,1 |
| 21 | 320,0 | 3,0 | 28,3 | 0,8 |
| 35 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 63 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.



La representación gráfica (Fig. 48) se llevó a cabo representando en abscisas el tiempo de incubación, expresado en días, y en ordenadas, la actividad enzimática, expresada en U/muestra.

En esta gráfica la curva señalada con el signo \circ pertenece al líquido de cultivo, y la del signo \bullet al extracto de micelio.

Variación de la actividad enzimática de la Xilanasa durante la autólisis.-

Los resultados obtenidos para el líquido de cultiivo y extracto de micelio se hayan en la Tabla XVIII.

La representación gráfica (Fig. 49) se llevo a cabo representando en abscisas el tiempo de incubación (días) y en ordenadas la actividad enzimática (mU/muestra).

En la Fig. 49, la curva que se señala con el signo \circ pertenece al líquido de cultivo, y la señalada con el signo \bullet al extracto de micelio.

TABLA XVIII

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA XILANASA DURANTE LA AUTOLISIS

| Tiempo de incubación (dias) | mU/muestra | | mU/mg de proteínas | |
|--------------------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| | L.C. | Ext.M. | L.C. | Ext.M. |
| 5 | 68,0 | 90,2 | 11,7 | 13,3 |
| 6 | 138,0 | 55,5 | 19,7 | 7,0 |
| 13 | 277,6 | 41,6 | 30,5 | 5,3 |
| 21 | 347,2 | 27,7 | 30,7 | 7,5 |
| 35 | 231,4 | 34,7 | 22,0 | 21,6 |
| 43 | 254,0 | 0,0 | 23,9 | 0,0 |
| 50 | 254,0 | 0,0 | 23,9 | 0,0 |
| 63 | 254,0 | 0,0 | 24,1 | 0,0 |

Los resultados obtenidos resultan de la media de 3 experimentos.

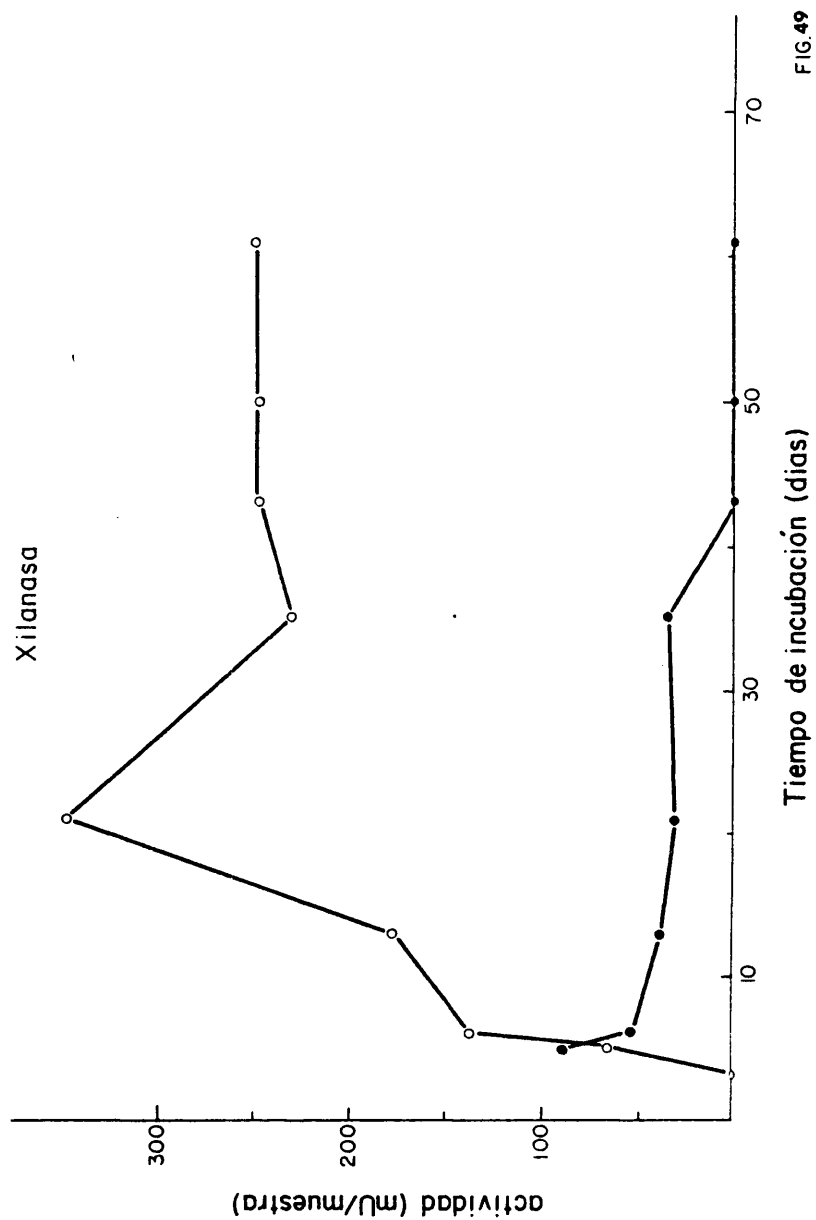


FIG.49

Separación entre la Polimetilgalacturonasa y la Pectinliasa.-

Esta prueba, realizada con el ácido tiobarbitúrico, como ya se indicó en el apartado de "Materiales y Métodos", no nos ha aclarado ningún resultado, ya que no encontramos en el espectro de absorción estudiado (480 a 580 nm), ningún pico que indique la presencia de una u otra enzima.

Columna

En un primer intento de separar las enzimas encontradas en la autólisis de Botrytis cinerea, encontramos una curva de actividad que queda reflejada en la Fig. 50.

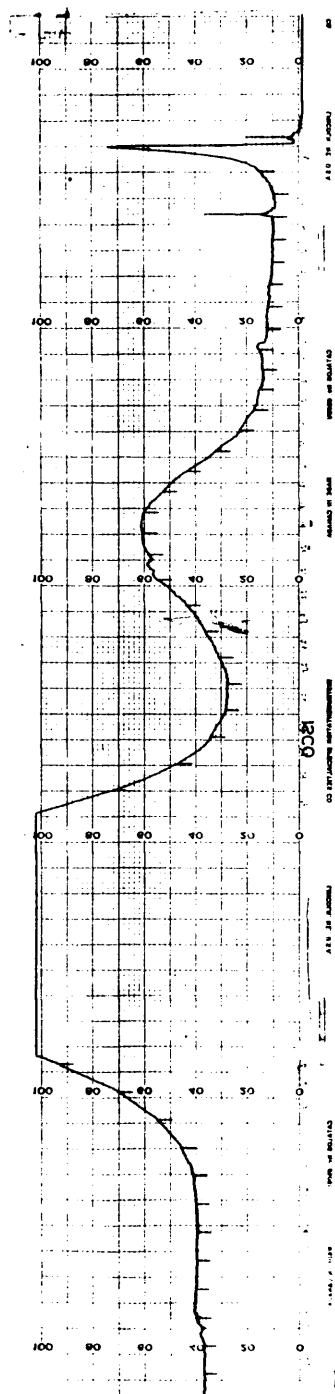
Estudiando las fracciones donde se hallaba actividad en la columna, pudimos encontrar solo tres enzimas (Fig 51):

- β -N-acetilglucosaminidasa: actividad en las fracciones - de 7 a 27, con un máximo en la fracción nº 15.
- (1,3)- β -glucanasa: actividad en las fracciones nº 31 a 51, con un máximo en la fracción nº 43.
- α -amilasa: actividad en las fracciones nº 31 a 47, con - un máximo en la fracción 41.

No se detectó en ninguna fracción actividad de las siguientes enzimas:

- Poligalacturonasa
- Polimetilgalacturonasa
- Endopectinliasa
- Exopectinliasa
- Pectinesterasa
- Xilanasasa

posiblemente debido a una inactivación de estas enzimas a su paso por la columna.



197

Fig 50

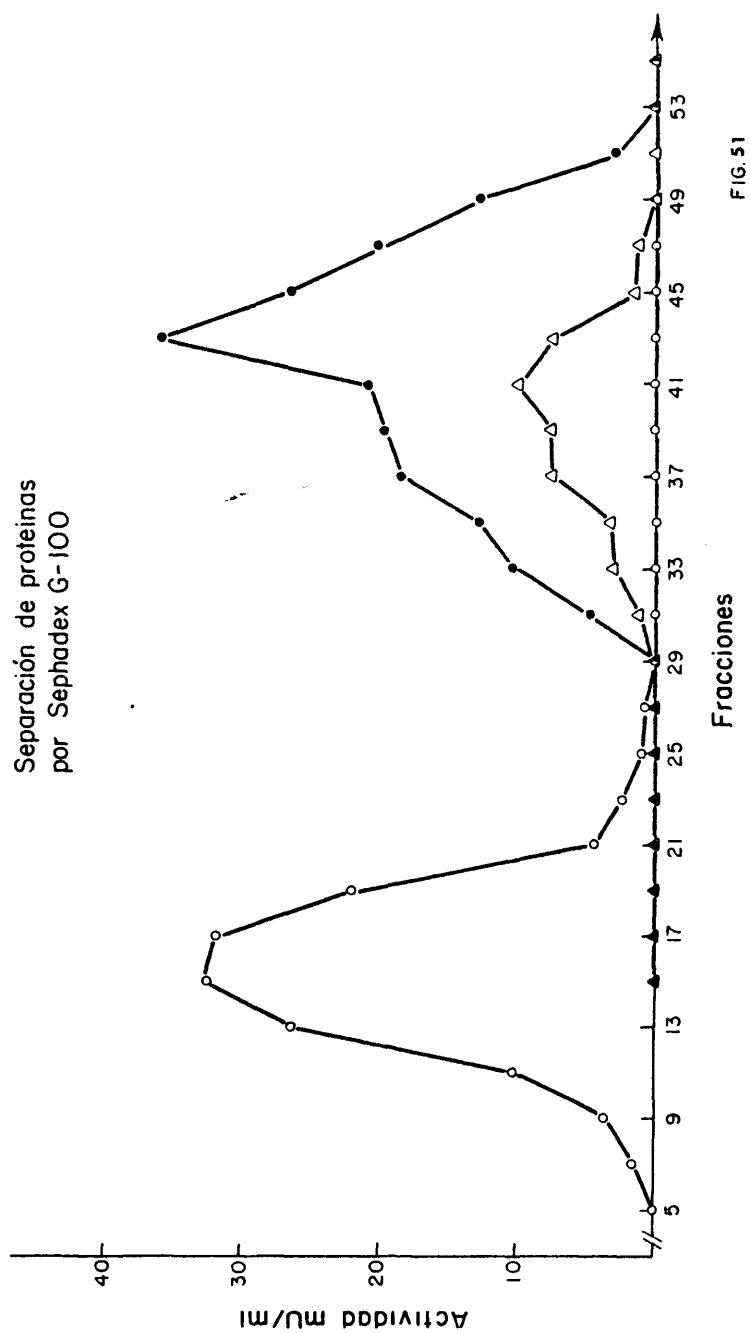


FIG. 51

Cromatografías.-

Con el fin de ver los productos de reacción de - las enzimas xilanasa y pectinliasas, se hicieron una serie de cromatografías de las que podemos deducir:

- La xilanasa, como producto de reacción produce xilosa.
- Las pectinliasas, como producto de reacción producen ácido galacturónico, además de otras sustancias que pudieran ser otros ácidos urónicos (dímeros o trímeros del ga lacturónico).

Paredes celulares.-

En Botrytis cinerea, pudimos obtener paredes de 3 y 7 días.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

Los grados de lisis alcanzados por estas paredes con el tiempo de incubación, se encuentran agrupados en la siguiente Tabla:(Pared más solución de enzima)

| Horas de incubación | 3 días | | 7 días | |
|---------------------|--------|------------------|--------|---------------|
| | U.A. | Grado de lisis % | U.A. | Grado lisis % |
| 0 | 0,41 | - | 0,81 | - |
| 1 | 0,39 | 4,7 | 0,77 | 4,9 |
| 3 | 0,35 | 14,7 | 0,71 | 12,4 |
| 5 | 0,33 | 19,6 | 0,64 | 20,9 |
| 24 | 0,29 | 29,3 | 0,60 | 25,9 |
| 48 | 0,24 | 41,5 | 0,55 | 32,1 |
| 96 | 0,20 | 51,2 | 0,51 | 30,8 |
| 120 | 0,20 | 51,2 | 0,51 | 30,8 |

Los blancos de paredes hervidas, no presentaron ninguna alteración durante las 120 horas de incubación. Los blancos de paredes sin hervir, experimentan una ligera lisis a lo largo del tiempo de incubación, producida por el efecto lítico endógeno de las enzimas que quedan retenidas en la pared. Los grados de lisis alcanzados por estos blancos están representados en la Tabla siguiente:

| Horas de incubación | 3 días | | 7 días | |
|---------------------|--------|------------------|--------|------------------|
| | U.A. | Grado de lisis % | U.A. | Grado de lisis % |
| 0 | 0,23 | - | 0,36 | - |
| 1 | 0,22 | 4,4 | 0,33 | 8,4 |
| 3 | 0,20 | 13,1 | 0,32 | 11,1 |
| 5 | 0,20 | 13,1 | 0,32 | 11,1 |
| 24 | 0,19 | 17,4 | 0,30 | 16,7 |
| 48 | 0,19 | 17,4 | 0,29 | 19,4 |
| 96 | 0,19 | 17,4 | 0,29 | 19,4 |
| 120 | 0,19 | 17,4 | 0,29 | 19,4 |

Los blancos de pared con enzima hervida presentan la misma actividad que los blancos de paredes sin hervir.

Valoraciones realizadas en el hidrolizado de las paredes de 3 días después de 120 horas de incubación.-

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla siguiente:

| | Pared + Sol.Enzima | | Pared + tampón | |
|-----------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| | U.A. | µmoles/ml | U.A. | µmoles/ml |
| Carbohidratos totales | 0,44 | 0,68 | 0,21 | 0,32 |
| Sustancias reductoras | 0,15 | 0,41 | 0,08 | 0,19 |
| Glucosa oxidasa | 0,43 | 0,25 | 0,19 | 0,11 |
| N-acetil-glucosamina | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Actividad enzimática encontrada en paredes de 3 días.-

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla siguiente; (Tiempo de incubación 3 horas):

| | <u>U.A.</u> | <u>Actividad (mU/ml)</u> |
|-----------------------------------|-------------|--------------------------|
| β -N-acetil-glucosaminidasa | 0,40 | 4,44 |
| (1,3)- β -glucanasa | 0,04 | 3,08 |
| α -amilasa | 0,02 | 1,54 |
| Poligalacturonasa | 0,00 | 0,00 |
| Polimetilgalacturonasa | 0,00 | 0,00 |
| Pectinesterasa | 0,00 | 0,00 |
| Exopectinliasa | 0,06 | 13,04 |
| Endopectinliasa | * 17" | 3326,80 |
| Xilanasa | 0,0 | 0,00 |

* La actividad de la endopectinliasa se mide viendo el descenso en la viscosidad.

Microscopia electrónica.-

La estructura externa que presentan las paredes de 3 días de Botrytis cinerea, se observó al microscopio electrónico en preparaciones sombreadas con Au/Pd.

Esta estructura se estudió a medida que avanzaba la lisis de las paredes celulares de este hongo, con sus propias enzimas. Esto ha quedado reflejado en las siguientes figuras:

Fig. 52 : Paredes sin atacar.

a.- 36.000 aumentos.

b.- 36.800 aumentos.

Fig. 53 : Paredes atacadas durante 24 horas.

a.- 34.500 aumentos.

b.- 25.300 aumentos.

Fig. 54 : Paredes a las 48 horas de ataque.

a.- 25.000 aumentos.

b.- 25.300 aumentos.

Fig. 55 : Paredes a las 96 horas de ataque.

a.- 29.900 aumentos.

b.- 64.800 aumentos.

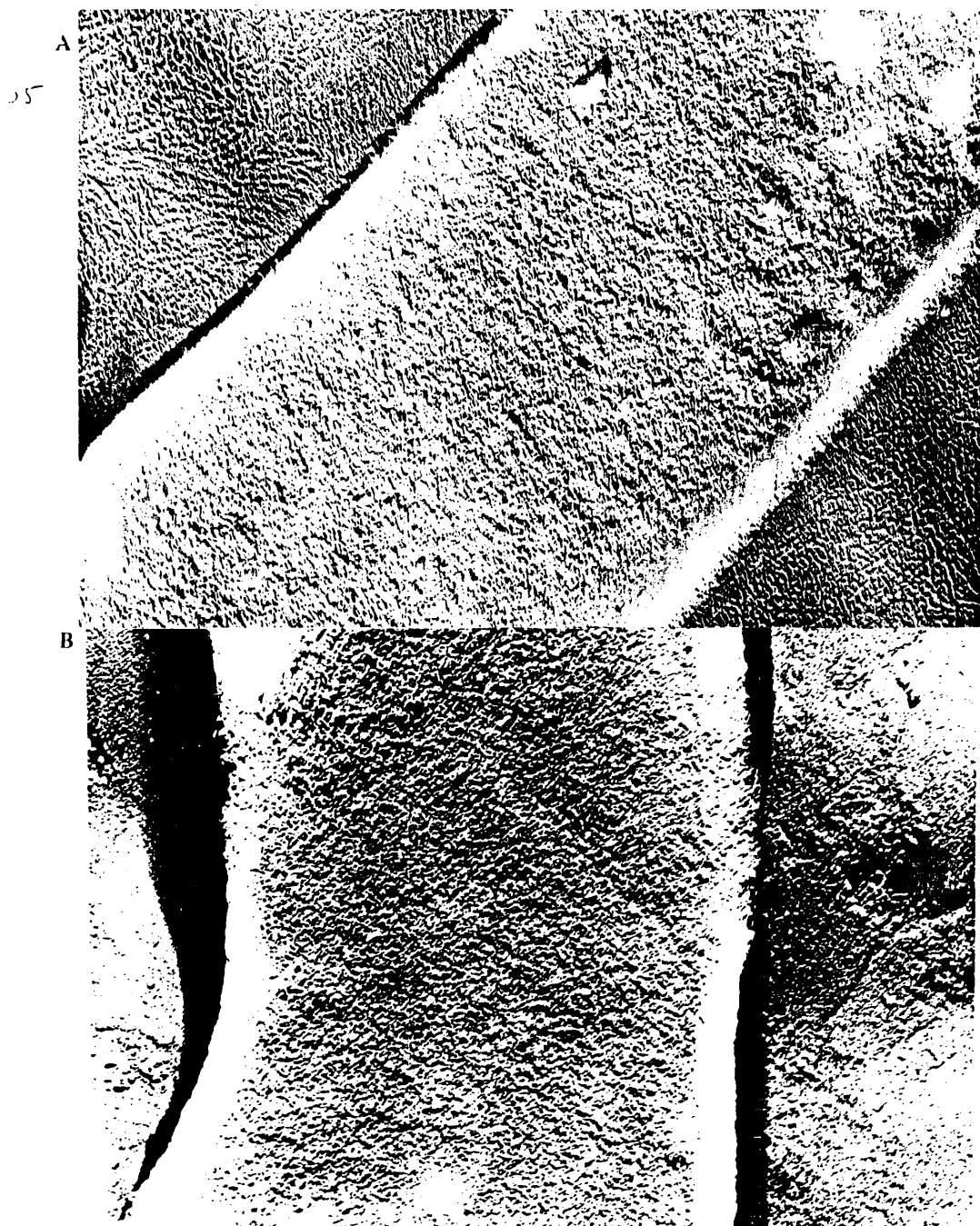


FIG 52



FIG. 53

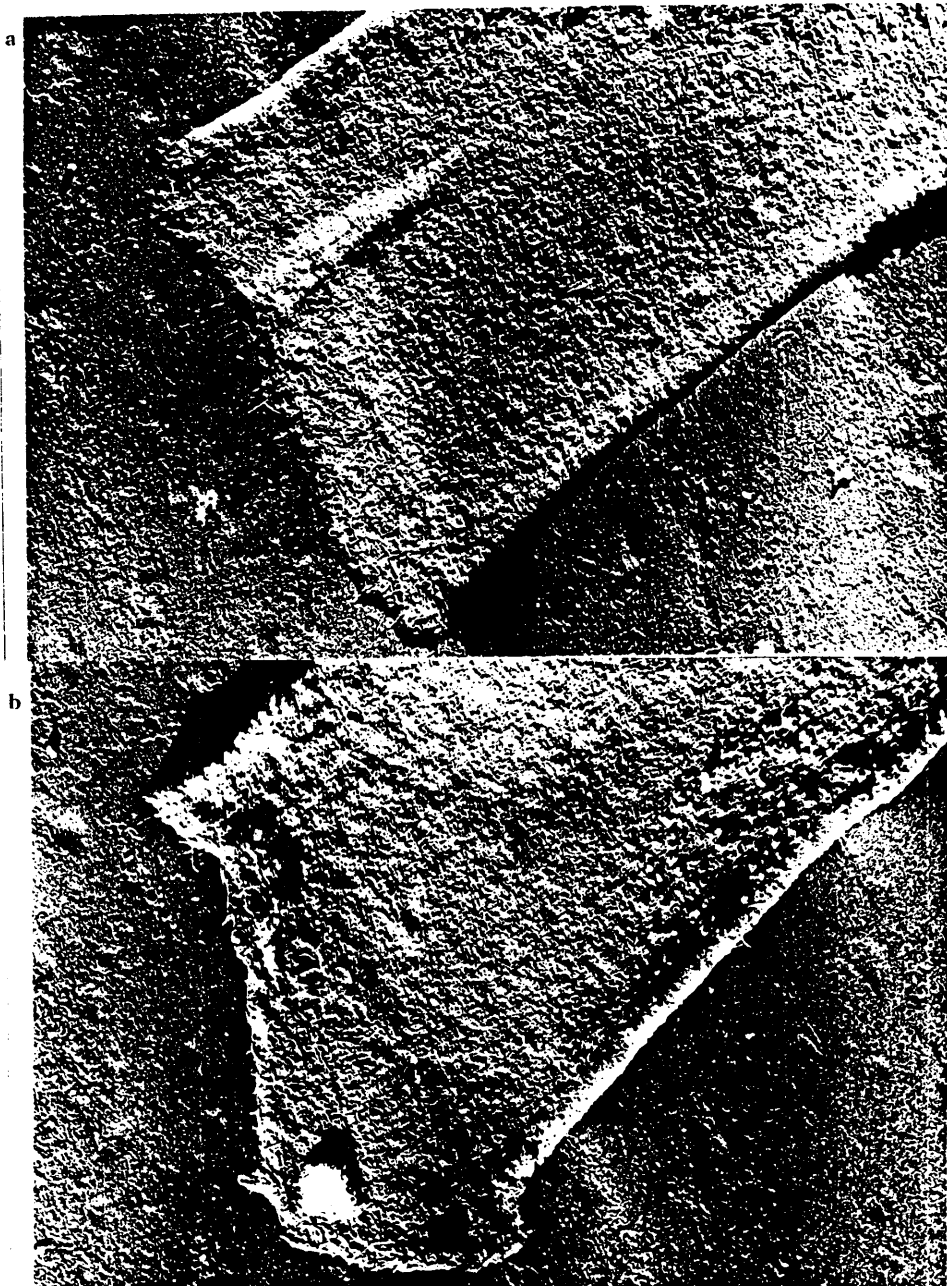


FIG. 54

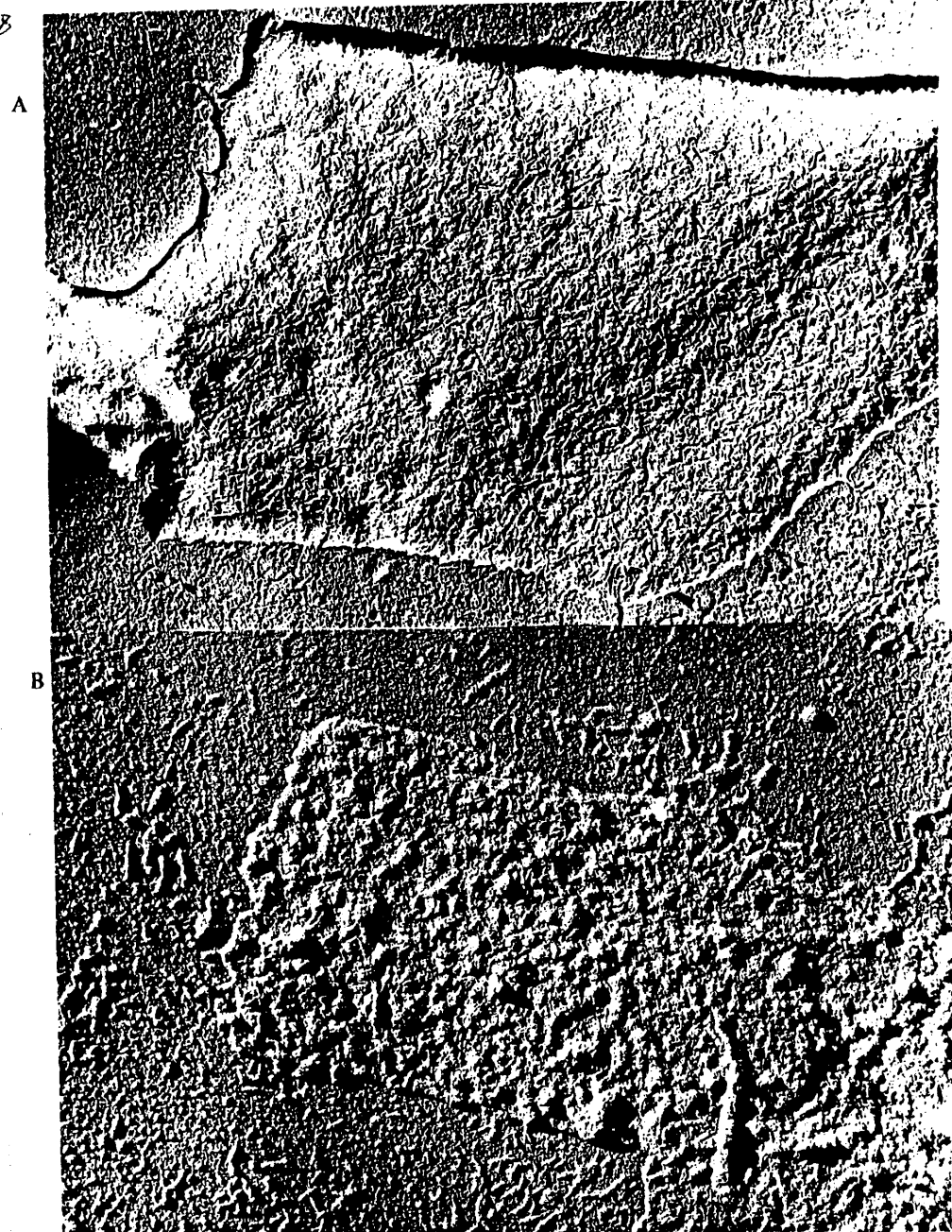


FIG. 55

Experimentos en plantas de judía. (*Phaseolus vulgaris*)

Una vez que las plantas de judía han empezado a crecer, y brota la 4ª hoja, se efectúa la inoculación con solución de enzimas de Botrytis cinerea. Para cada experimento se utilizaron dos plantas control y 3 problema. (Los experimentos se repitieron 3 veces, obteniéndose los mismos resultados).

Actividad enzimática de la solución de enzimas empleada.-

La actividad enzimática de la solución de enzimas empleada para inocular las plantas, se recoge en la siguiente Tabla:

| | <u>U.A.</u> | <u>Tiempo de incubación</u> | <u>Actividad (mU/ml)</u> |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------|
| β -N-acetil-glucosaminidasa | 0,88 | 15' | 117,3 |
| α -amilasa | 0,46 | 15' | 425,9 |
| (1,3) - β -glucanasa | 0,63 | 15' | 583,3 |
| Poligalacturonasa | 0,05 | 120' | 5,7 |
| Polimetilgalacturonasa | 0,10 | 120' | 11,5 |
| Exopectinliasa | 0,66 | 300' | 143,4 |
| Endopectinliasa | * 30" | 300' | 1330,0 |
| Pectinesterasa | 0,00 | 300' | 0,0 |
| Xilanasa | 0,75 | 120' | 117,3 |

* La lectura de la endopectinliasa se efectúa mirando descenso de viscosidad.

Efecto de la inoculación.-

A los 7 días de ser inoculada, una de las plantas problema perdió su primera hoja. Los tallos de las plantas problema empezaban a notarse macerados.

A los 14 días, las otras dos plantas problema perdieron todas sus hojas dañadas por la inoculación.

A los 21 días, una de las plantas problemas había perdido todas sus hojas, y las otras solo tenían los nuevos brotes que iban apareciendo.

Los tallos de todas las plantas dañadas con solución de enzima, se encontraban muy macerados, y alguno con una especie de tumoración abultada.

Las plantas control no sufrieron ningún daño a lo largo de todo el experimento.

Dos de las plantas problema, que habían perdido sus hojas, se rehicieron a partir de la zona dañada dando nuevos brotes.

Todo esto puede observarse en las siguientes figuras:

Fig. 56: a) Comparación entre la planta atacada y la control
b) Planta atacada
c) Planta control

Fig. 57: a) A la derecha hoja atacada, a la izquierda hoja control.
b) a la izquierda hoja control, a la derecha hoja atacada después de caerse de la planta.

Fig. 58: a) izquierda hoja atacada caída de la planta, derecha hoja control.

b) Hojas empezando a ser atacadas.

Fig. 59: a) Tallo control.

b) Tallo atacado al final del periodo de incubación.

Fig. 60: a) Tallo control.

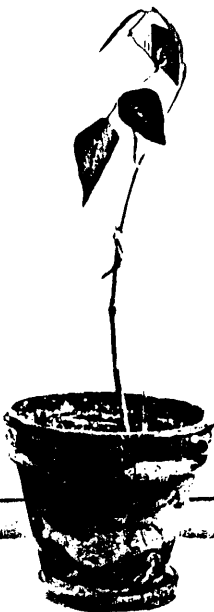
b) Tallo atacado al principio del periodo de incubación.

El experimento se concluyó a los 50 días de incubación, al no notarse otros cambios.

A



B

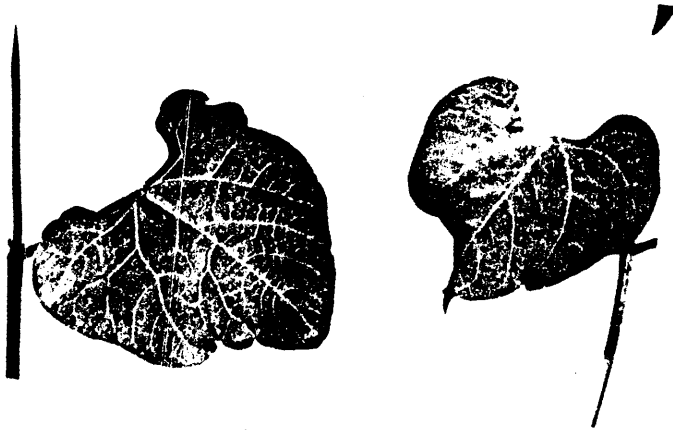


C



FIG 56

A



B



FIG. 57

214

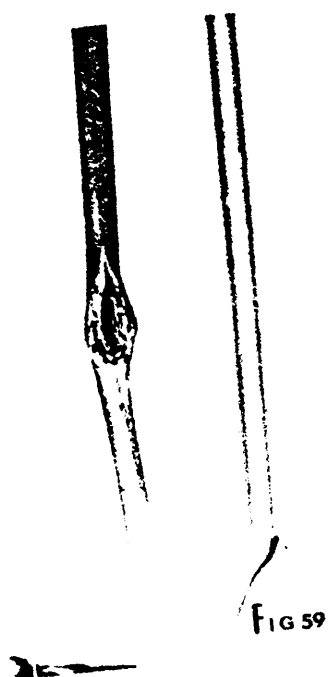
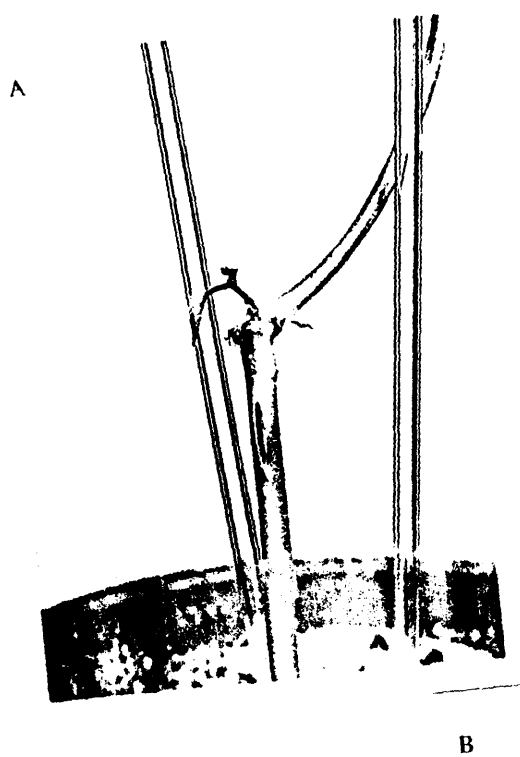
A



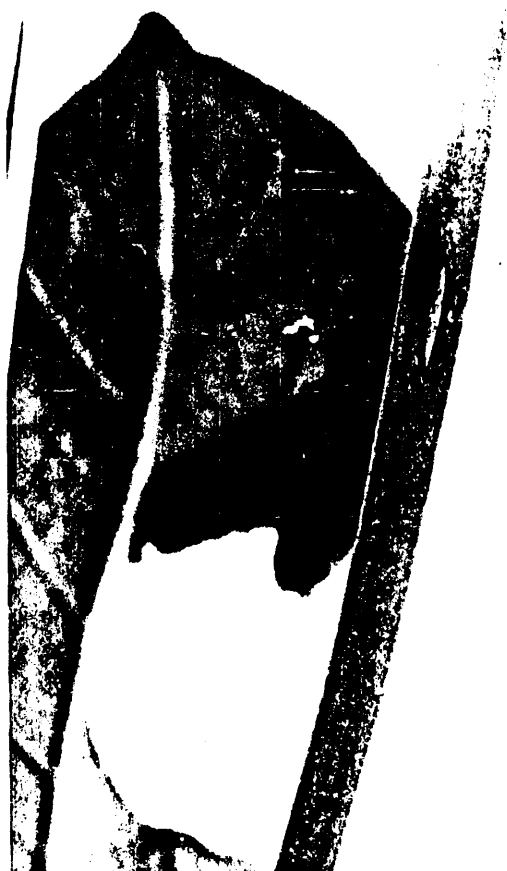
B



FIG 58



A



216

B



FIG 60

Maceración de tejidos.-

La maceración de tejidos se llevo a cabo en patata, manzana y zanahoria.

Los resultados de las valoraciones realizadas se encuentran en las Tablas siguientes:

Patata

| | <u>Sust.reductoras</u> <u>µmoles/ml</u> | <u>Conductividad</u> <u>µmho/cm</u> | <u>Galacturónico</u> <u>U.A.</u> |
|--------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| Tampón + enzima | 0,88 | $4,12 \cdot 10^{-3}$ | 0,71 |
| Tampón + agua | 0,66 | $3,88 \cdot 10^{-3}$ | 0,22 |
| Agua + enzima | 0,88 | $2,22 \cdot 10^{-3}$ | 0,40 |
| Agua | 0,19 | $1,20 \cdot 10^{-3}$ | 0,24 |

Manzana

| | <u>Sust.reductoras</u> <u>µmoles/ml</u> | <u>Conductividad</u> <u>µmho/cm</u> | <u>Galacturónico</u> <u>U.A.</u> |
|--------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| Tampón + enzima | 15,27 | $3,4 \cdot 10^{-3}$ | 0,34 |
| Tampón + agua | 10,55 | $3,1 \cdot 10^{-3}$ | 0,27 |
| Agua + enzima | 15,83 | $6,8 \cdot 10^{-4}$ | 0,35 |
| Agua | 10,27 | $2,1 \cdot 10^{-4}$ | 0,25 |

Zanahoria

| | Sust. reductoras $\mu\text{moles/ml}$ | Conductividad $\mu\text{mho/cm}$ | Galacturónico U.A. |
|--------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| Tampón + enzima | 20,80 | $34,0 \cdot 10^{-4}$ | 0,29 |
| Tampón + agua | 18,33 | $8,5 \cdot 10^{-4}$ | 0,25 |
| Agua + enzima | 17,77 | $34,0 \cdot 10^{-4}$ | 0,37 |
| Agua | 16,94 | $9,7 \cdot 10^{-4}$ | 0,27 |

El método de detección de ácido galacturónico se ha utilizado cualitativamente.

El volumen de células sedimentadas queda reflejado en las siguientes figuras:

Fig.61 a) Tubo 1: Volumen de células de patata, sedimentadas, en tampón con enzima.

Tubo 2: Volumen de células de patata sedimentadas, en tampón más agua.

Tubo 3: Volumen de células sedimentadas de patata, en agua más enzima.

Tubo 4: Volumen de células de patata sedimentadas, en agua.

b) Células de patata encontradas en el sedimento.

Fig.62 a) Tubo 1: Volumen de células sedimentadas de manzana en tampón con enzima.

Tubo 2: Volumen de células de manzana sedimentadas, en tampón con agua.

Tubo 3: Volumen de células sedimentadas, de manzana, en agua con enzima.

219.

Tubo 4: volumen de células sedimentadas de manzana en agua.

b) Células de manzana encontradas en el sedimento.

220

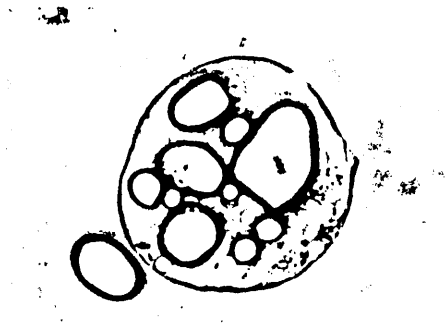
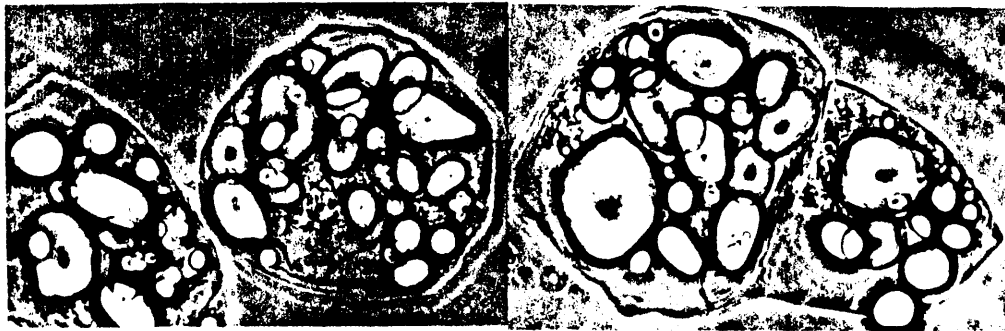


FIG 61

221

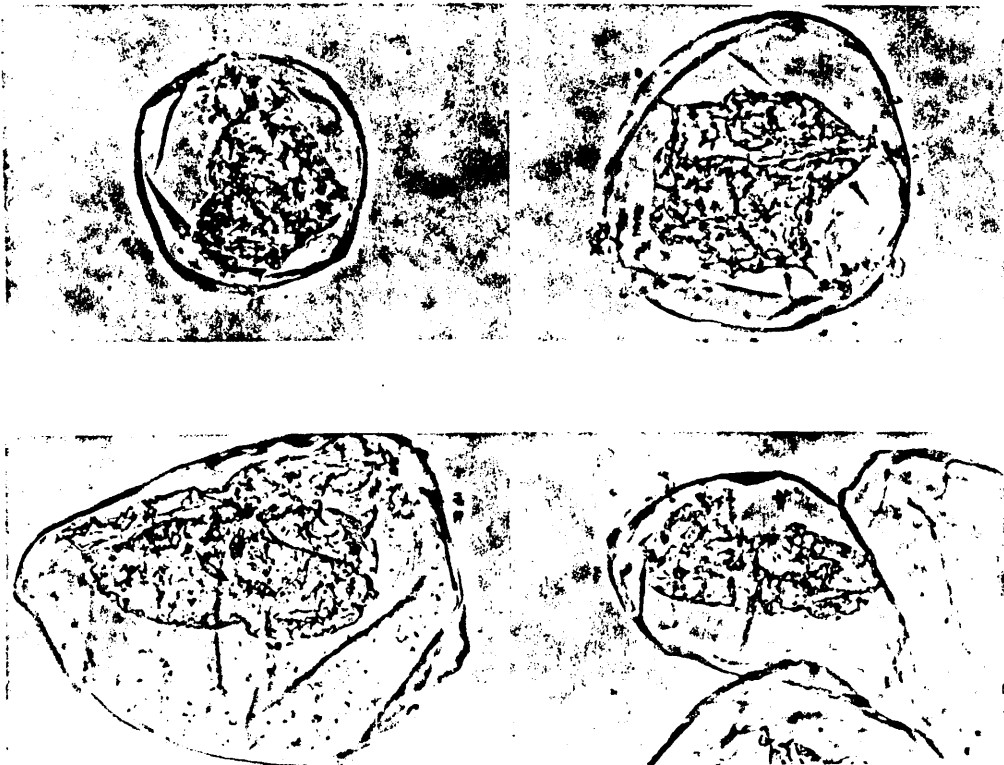
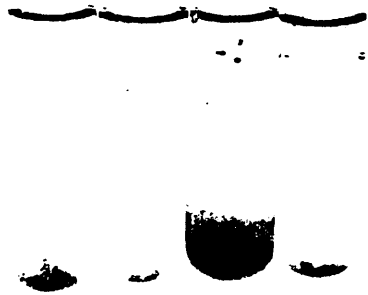


Fig 62

Localización histoquímica de la β -N-acetilglucosaminidasa al microscopio óptico.-

La localización de la β -N-acetilglucosaminidasa se llevó a cabo en micelio de 6 y de 11 días.

En micelio de 6 días, puede verse que la localización de esta enzima se encuentra en el citoplasma. Esta localización se observa en forma de gruesos puntos rojos (debido al colorante) que en las fotografías quedan reflejados de color negro. En el micelio tratado previamente con inhibidor, tanto como en el micelio que no ha sido incubado con el sustrato, no existe localización de esta enzima. Esto puede observarse en las siguientes Figuras:

Fig. 63: micelio de Botrytis cinerea previo tratamiento con el inhibidor, y micelio sintratamiento alguno.

Fig. 64: micelio tratado con el sustrato de la β -N-acetilglucosaminidasa y su localización.

En micelio de 11 días, observamos que el micelio está más autolizado. Los resultados en cuanto a localización, son los mismos que para el micelio de 6 días. Esto puede observarse en las figuras:

Fig. 65: micelio previo tratamiento con inhibidor o sin tratamiento ninguno.

Fig. 66: micelio tratado para localizar esta enzima.



FIG. 63

224

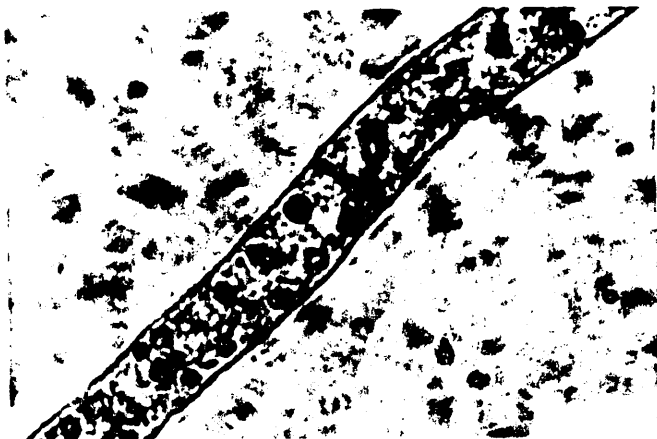
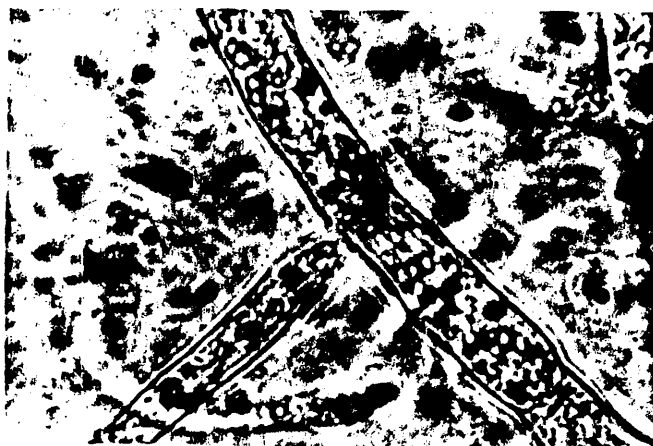


FIG. 64

225

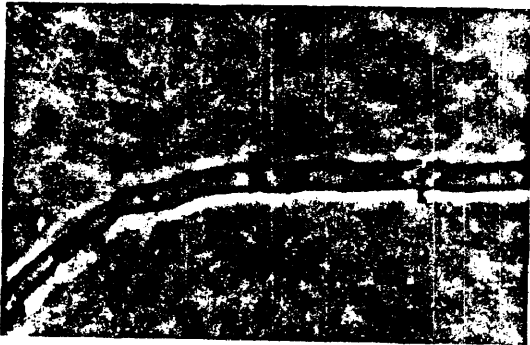
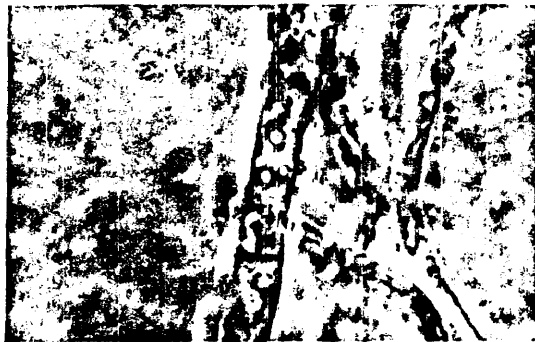
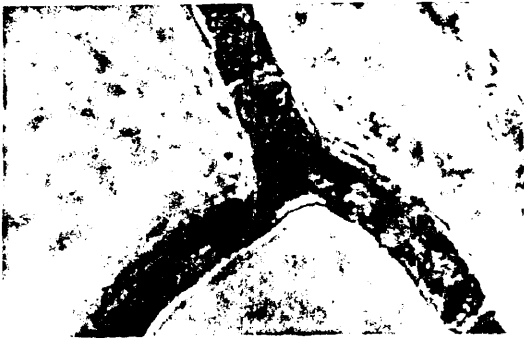


FIG. 65

226

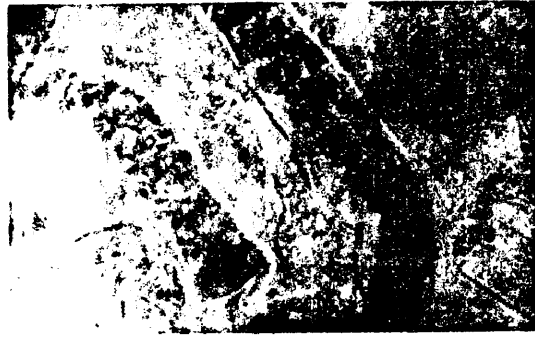
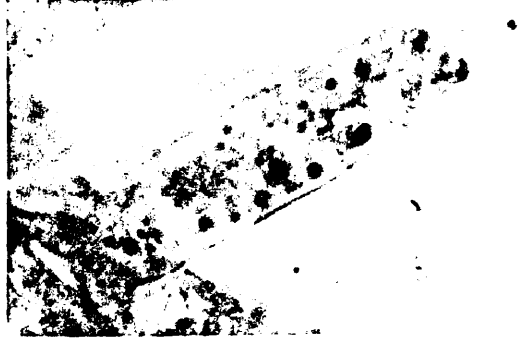
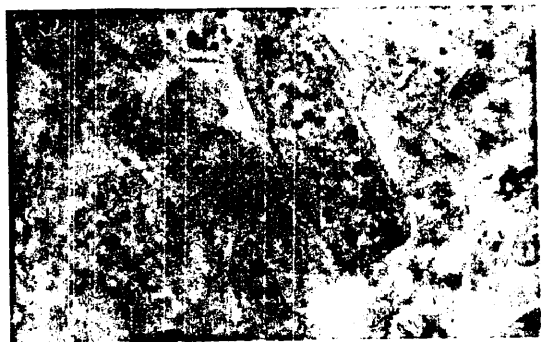
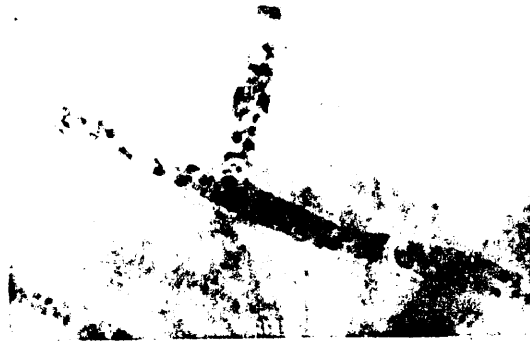
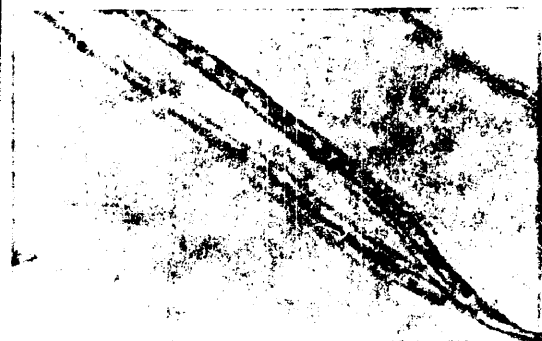


FIG.66

Localización histoquímica de la β -N-acetilglucosaminidasa al microscopio electrónico.-

La localización de la β -N-acetilglucosaminidasa al microscopio electrónico se llevó a cabo en micelio de 11 días.

A pesar de que la fijación del tejido no es perfecta, hemos podido observar que esta enzima se encuentra localizada dentro de las vacuolas. Esta localización se observa en forma de grandes puntos negros que se encuentran en el interior de las vacuolas. (Fig. 67)

El tejido tratado con inhibidor, previa fijación con el sustrato, no tiene localización de esta enzima o la tiene muy atenuada debido a que el inhibidor no haya podido actuar totalmente. (Fig. 68)

El tejido (micelio) sin tratamiento con el sustrato, no presenta ninguna localización, pudiéndose observar las vacuolas vacías. (Fig. 68).

Fig. 67: a) 20.400 aumentos.
b) 14.960 aumentos.

Fig. 68: a) micelio sin tratamiento. 33.000 aumentos.
b) micelio tratado con inhibidor. 37.400 aumentos.



Fig 67

A



B



Fig 68

DISCUSSION

La fase autolítica en microorganismos y particularmente en hongos filamentosos, ha sido poco estudiada en comparación con las demás fases de crecimiento, aunque es de suyo interés, no solamente por su valor teórico, sino por la importancia que pueda tener en los aspectos ecológico y patológico y como fuente de producción de enzimas líticas y otros metabolitos aprovechables para diversos fines, principalmente en Medicina y Bioquímica.

Desde los primeros estudios llevados a cabo sobre autólisis en hongos filamentosos, se considera esta fase como un fenómeno muy complejo, de larga duración, el cual puede transcurrir de diferente manera al variar las condiciones tanto físicas como químicas en las que se desarrolla el proceso.

En la búsqueda exhaustiva a través de la bibliografía de hongos filamentosos, no parece encontrarse ninguna investigación sobre la autólisis de Botrytis cinerea, salvo un trabajo de Lahoz y col. (1971) que estudia los cambios en la concentración de polioles en los cultivos autolizados de este hongo, que en las condiciones descritas alcanza un grado de autólisis de un 69% a los 100 días de incubación, siendo el proceso autolítico muy lento. Por el contrario, en las condiciones descritas en nuestro trabajo, tanto el crecimiento como la autólisis son procesos muy rápidos, correspondiendo el día cero de autólisis al sexto día de crecimiento; el proceso autodegradativo es muy intenso, observándose una pérdida de peso seco de micelio o grado de autólisis de un 51% en los primeros días del proceso, llegando a ser de un 80% a

los 41 día de incubación, permaneciendo constante durante 30 días más (Fig.9).

Una vez más se comprueba que la iniciación de la autólisis coincide con la desaparición de la fuente carbonada del medio de cultivo (Leal y col, 1968) (Pág. 98).

El pH del medio experimenta un ligero incremento a través del proceso de autólisis, pues en los primeros días - el pH oscila entre 5,5 y 6,5, para luego alcanzar el valor - constante de 6,9 (Fig.11).

La glucosa existente en el micelio en los primeros días del proceso, es metabolizada paulatinamente por el hongo, no encontrándose indicios de glucosa en los extractos de micelio al final de la autólisis (pág. 98).

Las variaciones que experimentan las proteínas a través de la autólisis, tanto en el líquido de cultivo como en los extractos de micelio, pueden verse en la página 100 . Hay una acumulación progresiva de proteínas en el líquido de cultivo a lo largo del proceso de autólisis, paralelamente - ocurre una disminución de las proteínas extractables del micelio de Botrytis cinerea, siendo un valor relativamente constante la suma de las proteínas encontradas en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio durante este proceso.

Según la clasificación de los hongos llevada a cabo por Barnicki-Garcia (1968), de acuerdo con la composición de la pared de los hongos, Botrytis cinerea, pertenece al - grupo V de esta clasificación, siendo quitina-glucanos los - componentes principales de su pared celular. Esto se confir-

ma con los estudios llevados a cabo por Leal y col. (1979), sobre la composición de los esclerocios de Botrytis cinerea en donde encuentran un glucano soluble que tiene la misma - composición que un glucano extracelular producido por este - hongo (Leal, Ruperez y Gomez-Miranda, 1979). Este polisacárido es un β -glucano con enlaces (1,3) predominantemente en un 66% enlaces (1,6) en un 23% y enlaces (1,4) en un 11%, siendo - probablemente la fracción insoluble o resistente un polisacárido complejo de quitina y este glucano (Leal, comunicación personal).

Las enzimas líticas que presentan mayor actividad en la autólisis de Botrytis cinerea, son la β -N-acetilglucosaminidasa y la (1,3)- β -glucanasa. Las actividades de estas enzimas se acumulan progresivamente en el líquido de cultivo y permanecen constantes en los extractos de micelio a través de este proceso degradativo, pudiendo actuar sobre quitina y glucanos de la pared celular de este hongo.

La β -N-acetilglucosaminidasa, es una enzima que hidroliza oligómeros de N-acetilglucosamina probablemente producidos en la hidrólisis de la quitina. Así como la actividad quitinásica encontrada tanto en el líquido de cultivo como en los extractos de micelio, es muy pequeña, y solamente existe en los primeros días de autólisis (Tabla II), la β -N-acetilglucosaminidasa es una enzima que presenta una actividad muy alta. Este enzima se encuentra tanto en el crecimiento como en la autólisis. Su actividad en el líquido de cultivo aumenta a medida que avanza el proceso autolítico hasta - los 26 días de incubación; a partir de este momento, la actividad alcanzada se mantiene constante durante todo el proce-

so. En los extractos de micelio hay un decrecimiento gradual de la actividad enzimática, con valores constantes al final del proceso (Fig.41). Las constantes cinéticas de esta enzima, parcialmente purificada, son $K_m = 1,25 \text{ mM}$ y $V_{m\acute{a}x} = 1,66 \text{ U/ml}$ (Fig.14) presentando inhibición por exceso de sustrato, análogamente a la β -N-acetilglucosaminidasa encontrada en la autólisis de Sclerotinia fructigena (Reyes y Byrde, 1973). El enzima presenta un pH óptimo de 5,0 unidades (Fig.12) y una actividad específica lineal con la concentración del enzima (Fig.13).

La (1,3)- β -glucanasa se detecta en los extractos de micelio al iniciarse la autólisis (Fig.42) y en los primeros días en que el proceso degradativo es muy intenso, su actividad total es alta por muestra, aunque su actividad específica (mU/mg de proteínas) es prácticamente constante durante todo el proceso. Esta actividad también se detecta en el líquido de cultivo al iniciarse el proceso, aunque en niveles muy superiores a los existentes en los extractos de micelio. Esto coincide con lo encontrado para Neurospora crassa (Reyes, Lahoz y Val Moreno, 1979) en 9 medios con diferentes fuentes de carbono o nitrógeno, en los que siempre la aparición de esta enzima coincide con la iniciación de la autólisis. Esta enzima parcialmente purificada, presenta un pH óptimo de 4,0 unidades (Fig.15), su actividad específica es lineal al aumentar la concentración del enzima (Fig. 16) y sus constantes cinéticas son $K_m = 9,09 \text{ mM}$ (considerando la laminarina como equivalente de glucosa) y $V_{m\acute{a}x} = 166 \text{ mU/ml}$ (Fig. 17).

Otro enzima, que parece ser no está directamente implicado en la lisis de la pared celular pero si en la de los carbohidratos de reserva, es la α -amilasa. Se detecta antes de comenzar la autólisis, y hay un aumento de actividad al iniciarse este proceso. A los 20 días de crecimiento desaparece en los extractos de micelio y presenta la máxima actividad en el líquido de cultivo. A partir de esta fecha, hay un decrecimiento gradual en el líquido de cultivo, quedando esta actividad constante a partir de los 40 días de incubación (Fig.43). Esta α -amilasa presenta un comportamiento análogo a la α -amilasa producida en la autólisis de Aspergillus niger en cultivo en agitación (Gomez y col. 1977). Este enzima presenta un pH óptimo de 4,0 unidades (Fig.18) y un incremento lineal de la actividad específica con la concentración de enzima (Fig.19). Las constantes cinéticas de este enzima, parcialmente purificado, son $K_m = 1,62 \text{ mM}$ (considerando el almidón como equivalente de glucosa) y $V_{m\acute{a}x} = 357 \text{ mU/ml}$.

También se han estudiado una serie de enzimas que podían estar implicadas en la degradación de los (1,6)- β - y (1,4)- β -glucanos de la pared celular de este hongo. Estos enzimas se encuentran en concentraciones inferiores a la β -N-acetilglucosaminidasa y (1,3)- β -glucanasa. La (1,6)- β -glucanasa se encuentra solamente en los extractos de micelio al iniciarse la autólisis; en el líquido de cultivo aparece al iniciarse el proceso autolítico y su valor decrece hasta hacerse constante (Tabla IX).

La (1,4)(1,3)- β -glucanasa solamente se encuentra -

en el líquido de cultivo ya entrada la autólisis, acumulándose a lo largo del proceso. (Tabla X).

La celulasa, un enzima que también puede estar implicado en la degradación de las paredes celulares de plantas, sigue un comportamiento análogo a la (1,6)- β -glucanasa (Tabla VII).

Otro enzima analizado, que degrada α -glucanos, una dextranasa, no presenta actividad alguna ni en el crecimiento ni en la autólisis.

Pitt (1968) observó la localización de la fosfatasa ácida en partículas citoplásmicas de Botrytis cinerea; nosotros hemos estudiado el comportamiento de este enzima durante la autólisis. Se encuentra en los extractos de micelio desde el comienzo de la autólisis, decreciendo gradualmente su actividad hasta desaparecer al final del proceso (Tabla III). En el líquido de cultivo solo se detectó al iniciarse la autólisis.

La fosfatasa alcalina solo existe en pequeñas cantidades al comienzo de la autólisis y en los extractos de micelio (Tabla IV).

Otro enzima, que juntamente con la α -amilasa se encuentra en la autólisis de hongos filamentosos, es la invertasa. Nosotros solo hemos detectado este enzima, tanto en el líquido de cultivo como en los extractos de micelio, en los primeros días de autólisis (Tabla VI).

Es interesante destacar que no se detectó actividad proteolítica durante la autólisis de este hongo.

Cuando un patógeno ataca a una planta, la pared celular hace de barrera compleja, que requiere enzimas específicos para su degradación. Los patógenos han desarrollado la manera de reconocer la estructura química de la pared de la planta y elaborar los enzimas apropiados para atacar los diferentes constituyentes (Bateman y Basham, 1976).

Los enzimas capaces de llevar a cabo el ataque de las paredes celulares de las plantas por hongos fitopatógenos parece ser que son de tipo inductivo y como acabamos de ver se producen al enfrentarse el parásito con el huésped. La posible implicación de la autólisis en procesos patogénicos trae como consecuencia el estudio de la variación, durante este proceso degradativo, de los enzimas líticos capaces de degradar las paredes celulares de las plantas. Es probable que estos enzimas producidos por un patógeno en un cultivo "in vitro" puedan ser diferentes de los enzimas asociados con la patogénesis, aunque también tengan un efecto lítico sobre las paredes de las plantas y produzcan maceración de tejidos vegetales. De acuerdo con la composición de la pared celular de la planta hemos centrado nuestro estudio en pectinasas y xilanasas.

Los enzimas pecticos han sido agrupados de acuerdo a los siguientes criterios: (Bateman y Basham, 1976 y Rexova-Benkova y Markovic, 1976).

- 1º) Mecanismos por el cual son rotos los enlaces glicosílicos en la posición α -(1,4) (hidrolíticos o líticos).
- 2º) Especificidad del enzima para un sustrato determinado - (Pectina o ácido pectico).
- 3º) Posición en que ocurre la ruptura del enlace en la cade-

na péctica (en cualquier sitio de la cadena o en posición terminal).

El hongo Botrytis cinerea , en las condiciones descritas, produce distintas actividades líticas frente a las sustancias pécticas y hay variación de estas actividades a lo largo del proceso de autólisis. Todas estas actividades encontradas, no quieren decir que pertenezcan a enzimas diferentes y que el comportamiento de un enzima, frente a un sustrato determinado, no esté influido por la actuación de los otros enzimas presentes.

Poligalacturonasa .- La actividad de este enzima se encuentra en niveles superiores en el crecimiento, tanto en el extracto de micelio como en el líquido de cultivo. Durante la autólisis tiene lugar una disminución gradual de esta actividad; siempre los niveles de este enzima se encuentran en mas cantidad en el líquido de cultivo. (Fig.44). Este enzima presenta un pH óptimo de 2,5 (Fig.21) diferente del encontrado por Urbanek y Zalewska-Sobczak (1975) para una poligalacturonasa producida por Botrytis cinerea E.200 que presenta un pH óptimo de 4,0 unidades. Estos autores separan la actividad poligalacturonasa en dos componentes, aunque solamente uno de ellos fué caracterizado; este enzima no fué producida por Botrytis cinerea "in vitro" en las condiciones descritas por Hancock y col. (1964), pero si fué producido en un medio con glucosa y polipectato sódico, (Sherwood, 1966), presentando un pH óptimo de 5,0 unidades. La actividad específica de la enzima producida por nuestra cepa de Botrytis cinerea, aumenta linealmente a medida que aumen-

ta la concentración del enzima (Fig. 22). Su K_m y $V_{m\acute{a}x}$ son de 12,5 mM (considerando el sustrato como equivalentes de ga lacturónico) y 50 mU/ml respectivamente (Fig. 23).

Endopoligalacturonasa: no se detectó esta actividad, aunque sí se ha encontrado en cultivos de Botrytis cinerea sobre zanahoria (Van den Berg y Yang, 1969).

Polimetilgalacturonasa: presenta un comportamiento diferente al de la poligalacturonasa. En los extractos de mi celio está en niveles superiores en el crecimiento, cayendo su actividad rápidamente hasta desaparecer con el tiempo de incubación. Por el contrario, en el líquido de cultivo, se acumula hasta los 20 días de crecimiento y luego decrece con el tiempo de incubación hasta desaparecer (Fig.45). El pH óptimo de actuación de este enzima oscila entre 4,5 y 5,5 unidades (Fig.24). Presenta un incremento lineal de la actividad específica del enzima, a medida que aumenta la concentración de este (Fig.25). Su K_m y $V_{m\acute{a}x}$ son de 2,0 mM (considerando el sustrato como equivalente de ácido galacturónico) y 250 mU/^{ml} respectivamente (Fig.26). Una verdadera separación entre poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa, solo se podría hacer con enzimas purificadas, ya que como indican Urbaneck y col.(1975) al estar presente, también, en el complejo enzimático la pectinesterasa, puede ocurrir una de-esterificación de la pectina y por tanto puede actuar paralelamente la poligalacturonasa sobre el sustrato de-esterificado. Volvemos a insistir en que lo que se está determinando, en nuestro trabajo, es la actuación de todo un complejo enzimático, que varía con el tiempo de incubación, sobre un sustrato de-

terminado.

Exopectinlinasa: su comportamiento a lo largo del proceso autolítico es completamente diferente al de todas las enzimas pécticas estudiadas, ocurriendo una acumulación, tanto en el líquido de cultivo como en el extracto de micelio, en los primeros días de autólisis. A partir del séptimo día de autólisis en los extractos de micelio disminuye la actividad de este enzima hasta desaparecer. En el líquido de cultivo hay una acumulación progresiva con el tiempo de incubación, observándose después de 50 días de crecimiento un ligero descenso (Fig.46). La degradación de la pectina por este enzima no fué alterada por la presencia de iones Ca^{++} . El pH óptimo de actuación de este enzima fué de 8,0 unidades, (Fig.27). No se cumplía un aumento lineal de la actividad específica al aumentar la concentración de enzima, sino por el contrario ocurría una disminución lineal (Fig.28). Esto nos hizo pensar en la presencia de un posible inhibidor cuya concentración aumentaba al aumentar la concentración del enzima. Este inhibidor fué eliminado por diálisis, pudiendo observarse después un crecimiento lineal de la actividad específica al aumentar la concentración del enzima (Fig.29). En la diálisis también observamos que la enzima había perdido un 41% de su actividad inicial, análogamente a lo encontrado por Sherwood (1966). Este inhibidor, según pudimos comprobar, es dializable y no extractable con piridina, por tanto no es un azucar de bajo peso molecular. En la actualidad intentamos determinar la naturaleza del inhibidor y su acción sobre estas enzimas. El valor de su K_m es 3,0 mM (considerando el

sustrato como equivalentes de ácido galacturónico) y $V_{\text{máx}}$ es 71 mU/ml.

Endopectinliasa: Este enzima puede ser también la endopolimetilgalacturonasa, ya que siguiendo el procedimiento del ácido tiobarbitúrico de Neukon (1960) modificado por Sherwood (1966) no encontramos diferencias en la absorción a 510 y 550 nm respectivamente. En los extractos de micelio la actividad máxima se presenta en el crecimiento, decayendo gradualmente y llegando a desaparecer en la autólisis. En el líquido de cultivo aumenta hasta los 20 días de autólisis, disminuyendo después y manteniéndose un nivel constante hasta el final del proceso (Fig.47). Este enzima presenta dos pH óptimos uno a 3,5 y otro a 6,0 unidades (Fig.30). La actividad enzimática, análogamente a la de la exopectinliasa, es también inhibida al aumentar la concentración de enzima (Fig.31). El inhibidor parece ser el mismo que el de la otra liasa, ya que también es dializable y no extractable por piridina. La inhibición por diálisis es mayor, oscilando de un 50 a un 80%, observando mayor inhibición, por diálisis, cuando la dilución del enzima es mayor. Después de la diálisis la actividad específica varía linealmente, aumentando con la concentración de enzima (Fig.32). La K_m y $V_{\text{máx}}$ son 9,1 mM (referido el sustrato a equivalentes de galacturónico) y 25 U/ml respectivamente (Fig.33). Entre todas las enzimas pécticas estudiadas es la que se encuentra en niveles más altos.

Exopectatoliasa: Solamente presenta actividad en los extractos de micelio, desapareciendo al final del proceso autolítico. (Tabla XV)

Endopectatoliase: Solo se detecta durante el crecimiento y en los extractos de micelio. (Tabla XV)

Pectinesterase: Este enzima ha sido encontrado por Van den Berg y Yang (1969) en cultivos de Botrytis cinerea, así como por Urbanek y col. (1975). En nuestro trabajo se ha detectado durante el crecimiento y autólisis, tanto en extractos de micelio como en líquido de cultivo. En cuanto comienza la autólisis empieza a decrecer, llegando a desaparecer hacia el final del proceso (Fig.48). El pH óptimo de actuación del enzima fué de 5,5 unidades (Fig.35). El aumento de actividad específica es lineal al aumentar la concentración del enzima (Fig.36). La K_m es de 8,33 mM (considerando el sustrato como equivalentes de ácido galacturónico) y la $V_{máx}$ 1,11 U/ml (Fig.37).

Este hongo descompone las hemicelulósas de Lupinus hirsutus, Lupinus albus, e Impatiens balsamina (Thaysen y Bunker, 1927). Entre las hemicelulosas, hemos seguido la variación de la actividad xilanásica a través del proceso autolítico. Esta enzima aparece, en los extractos de micelio, en el crecimiento, decreciendo gradualmente su actividad durante este proceso, hasta desaparecer. En el líquido de cultivo se encuentra en concentraciones muy superiores, aumentando su actividad durante la autólisis y manteniéndose un nivel elevado durante este proceso degradativo (Fig.49). Su pH óptimo es de 4,5 unidades (Fig.38), presentando, también, su actividad específica un crecimiento lineal al aumentar la concentración del enzima (Fig.39). Su K_m es 0,1 mM (referido a equivalentes de xilosa), indicando una gran afinidad por

el sustrato. Su V_{max} es de 250 mU/ml (Fig.40).

El alto grado de lisis alcanzado por el hongo Botrytis cinerea con una pérdida de un 80,3 del peso seco del micelio, indica que además de la degradación citoplásmica - tiene que ocurrir una lisis de las paredes celulares.

La comprobación de que las paredes celulares son atacadas por el complejo enzimático obtenido de cultivos autolizados de 80 días, se ha llevado a cabo sobre paredes de 3 y 7 días (pág.201). Las paredes de 3 días pertenecen a - cultivos sin autolizar y las de 7 días a cultivos autolizados en un 31%.

Las paredes de 3 días se lisan en un 51%. El ataque es gradual con el tiempo de incubación de estas paredes con el complejo enzimático (pág.201) y el ataque termina a las 96 horas. En las paredes de 7 días el proceso ocurre paralelamente al anterior hasta las 48 horas de incubación, - en que termina la degradación, alcanzándose un grado de lisis de las paredes de un 30,8%.

Las paredes retienen enzimas líticas (pág.203), análogamente a lo encontrado por Polacheck y Rosenberg, 1975 y Reyes y Lahoz, 1977. Estos enzimas retenidos por las paredes producen un grado de lisis de un 17,4% y un 19,4% para paredes de 3 y 7 días respectivamente.

En paredes de 3 días, el 8,8% de la parte hidrolizada fué como glucosa libre, y el 24,1% como azúcares totales.

Las figuras 52, 53, 54 y 55 muestran el ataque de

las paredes de Botrytis cinerea con el tiempo de incubación. La Fig. 52, muestra las paredes sin atacar, observándose un aspecto granuloso. A las 24 horas de ataque (Fig.53) ha desaparecido el aspecto granuloso, probablemente porque se ha hidrolizado algún glucano amorfo y empieza a diferenciarse una estructura de fibrillas, probablemente de celulosa o quitina. A las 48 horas de incubación (Fig.54), y sobretodo por los extremos, se puede observar una perfecta red de microfibrillas, que se hace mucho más visible a las 96 horas de incubación (Fig.55). En esta última figura puede verse, además, un trozo de pared muy desorganizado y con gran cantidad de oquedades o puntos de ataque. Esto puede ser comparable a lo obtenido por Manocha y Colvin (1967), antes, y después, de someter las paredes de Neurospora crassa, primero a la acción de enzimas de caracol y posteriormente a la acción de tripsina.

La infección de una planta por un patógeno es un proceso muy complejo en el que intervienen diferentes factores. La extensión y el desarrollo de la enfermedad vienen determinados por la habilidad del patógeno para atacar la planta y la habilidad de la planta para movilizar sus mecanismos de protección frente a la infección.

Debido a la virulencia de Botrytis cinerea ha sido estudiada, por diferentes investigadores, la acción de este patógeno, sus esporas, y extractos de micelio, sobre plantas.

En 1915, Brown, estudió la acción de un extracto de Botrytis cinerea, sobre paredes de plantas y protoplastos, llegando a la conclusión de que había un enzima respon-

sable de la acción letal del extracto.

Wilson (1935,1937) hizo varios estudios sobre la acción de Botrytis cinerea en plantas de judía, observando una acción "agresiva" cuando en la planta se desarrollaba mucho el hongo, y una acción "no agresiva" cuando el desarrollo era menor. Esta acción se manifestaba en formas de manchas oscuras sobre las hojas (chocolate spot).

La patogenicidad de Botrytis cinerea y otros hongos, sobre la manzana, fué estudiada por Cole (1956), observando que las preparaciones pectolíticas más activas eran las de Botrytis cinerea, produciendo la putrefacción del fruto.

En 1961, Deverall y Wood, realizan dos trabajos sobre la infección de la judía con distintas especies de Botrytis, comprobando que la cepa de Botrytis fabae es más patógeno que Botrytis cinerea, aunque la actividad pectolítica de este último sea mayor.

En este trabajo hemos estudiado el ataque de la planta de judía (Phaseolus vulgaris) complejo enzimático producido en la autólisis de Botrytis cinerea, en el que hay gran diversidad de enzimas pecticas.

En la figura 56, pueden verse comparativamente la planta control y la planta tratada con enzimas líticas (hojas y tallo). La planta tratada fué perdiendo sus hojas poco a poco, siendo lo más característico que esta, después de 21 días de crecimiento, quedaba como en estado latente, en contraposición a la planta control que se desarrollaba normalmente. La caída de la primera hoja tratada tuvo lugar

a los 7 días. En la Fig.57 podemos observar en la parte de arriba un principio de ataque a la hoja, y abajo una hoja completamente atacada. Esto también se observa en la Fig.58 El ataque del tallo queda reflejado en la Fig. 59 y 60, al comparar el tallo control (a) con el tallo atacado (b); En la Fig.59 b, se aprecia una pequeña tumoración. Los resultados obtenidos, confirman, una vez más, la acción patogénica de este microorganismo, y la posible intervención de la autólisis en los procesos patogénicos.

La maceración de los tejidos es un síntoma característico de muchas enfermedades de las plantas, y consiste en la separación de las células del tejido. La base enzimática de este proceso fué estudiada por Brown (1915) y lo atribuyó a la digestión de la lamela media de las células de las paredes de las plantas. Los enzimas pécticos han sido asociados con este fenómeno de maceración.

La maceración de tejidos de patata y manzana con separación de células libres, puede verse en la Fig. 61 y 62 respectivamente, en las que se observa el volumen de células desprendidas después de 14 horas de incubación, en las condiciones indicadas, y las células encontradas en estos sedimentos. Estas células no se tiñen con rojo neutro, lo cual parece indicar que son células muertas.

En experimentos realizados con zanahoria no se observó desprendimiento de células del tejido. Todos estos resultados están de acuerdo con lo obtenido por Tribe (1955) y Fushtey (1957).

En el líquido sobrenadante de la maceración de los 3 tejidos estudiados, se observó un aumento de la con-

ductividad así como de las sustancias reductoras y ácido galacturónico después de 14 horas de incubación, de cada tejido con el complejo enzimático de Botrytis cinerea.

Estos resultados confirman el poder de maceración de las enzimas líticas de Botrytis cinerea obtenidos en cultivos autolizados de 80 días.

La localización histoquímica de la β -N-acetilglucosaminidasa en micelio de Botrytis cinerea, fué llevada a cabo en micelio de 6 y 11 días. Estos micelios presentaban diferentes concentraciones de β -N-acetilglucosaminidasa.

En micelio de 6 días, o sea micelio procedente de cultivos en los que se inicia la autólisis, la localización no es tan clara debido al gran contenido citoplasmico (Fig. 63 y 64). El micelio de 11 días, corresponde a cultivos autolizados en un 30%, el micelio presenta menos contenido citoplasmico y la localización de este enzima es más clara. (Fig. 65 y 66). Como puede verse hay gran diferencia entre los controles, uno sin llevar a cabo la reacción enzimática y otro con inhibidor, y el micelio en el que se ha llevado a cabo la reacción enzimática. Es visible que la β -N-acetilglucosaminidasa de Botrytis cinerea se encuentra localizada en partículas citoplásmicas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Pitt (1968) en los que pretendió demostrar la localización en partículas citoplasmicas o lisosomas de Botrytis cinerea diferentes enzimas como las fosfatasas ácidas, β -glucoronidasa y β -galactosidasa, etc.

La localización de este enzima se confirma al microscopio electrónico. (Fig. 67 y 68).

518

CONCLUSIONES

- 1.- La autólisis de Botrytis cinerea es un proceso autodegradativo rápido, llegando a una pérdida de peso seco de micelio de un 80%.
- 2.- El proceso autolítico transcurre entre pH 6,5 y 6,9.
- 3.- Las enzimas líticas estudiadas presentan mayor concentración en el líquido de cultivo que en el extracto de micelio.
- 4.- β -N-acetilglucosaminidasa: se acumula durante la autólisis en el líquido de cultivo y presenta un pH óptimo de 5,0 unidades y una $K_m=1,25$ mM.
- 5.- (1,3)- β -glucanasa: Es una de las enzimas que se encuentran en mayor concentración en el líquido de cultivo. Tiene un pH óptimo de 4,0 unidades y una $K_m=0,09$ mM.
- 6.- α -amilasa: Se acumula en el líquido de cultivo durante los primeros días de autólisis, para luego descender en su actividad, conservándose en niveles constantes - hasta el final del proceso. Presenta una $K_m=1,62$ mM y un pH óptimo de 4,0 unidades.
- 7.- Poligalacturonasa: presenta un comportamiento análogo a la α -amilasa. Su $K_m=12,5$ mM y su pH óptimo es de 2,5 unidades.
- 8.- Polimetilgalacturonasa: Se acumula en el líquido de cultivo durante la primera parte de la autólisis, desapareciendo al final de esta. Tiene una $K_m=2$ mM y su pH óptimo está entre 4,5 y 5,5 unidades.

- 9.- Exopectinliasa: es una de los enzimas que se acumula en el líquido de cultivo al final de la autólisis. Tiene una $K_m = 3,0$ mM y su pH óptimo es de 8,0 unidades.
- 10.- Endopectinliasa: comportamiento análogo a la poligalacturonasa, en el líquido de cultivo. Tiene una $K_m = 9,1$ mM y tiene dos pH óptimos que son 3,5 y 6,0.
- 11.- Pectinesterasa: se encuentra en niveles muy altos, en el líquido de cultivo, al iniciarse la autólisis, desapareciendo hacia la mitad del proceso. Tiene una $K_m = 8,3$ mM y el pH óptimo es de 5,5 unidades.
- 12.- Xilanasas: mantiene un nivel alto durante la autólisis, en el líquido de cultivo. Presenta una $K_m = 0,1$ mM y un pH óptimo de 4,5 unidades.
- 13.- El grado de lisis alcanzado por paredes de cultivos sin autolizar (3 días) fue de un 51,2%.
- 14.- El grado de lisis alcanzado por paredes de cultivos autolizados (7 días), fue de un 31%.
- 15.- Las paredes retienen enzimas líticas, que producen una lisis de un 17 y un 19% para paredes de 3 y 7 días respectivamente.
- 16.- Las hojas de la planta de judía son atacadas por el complejo enzimático producido durante la autólisis de Botrytis cinerea.

- 17.- El tallo de la planta de judia es atacado por el complejo enzimático producido durante la autólisis de este hongo.
- 18.- El complejo enzimático obtenido durante la autólisis de Botrytis cinerea, produce maceración de tejidos de patata y manzana con desprendimiento de células .
- 19.- El complejo de estas enzimas, produce maceración de patata, manzana y zanahoria, con aumento de sustancias pecticas e iones en el medio.
- 20.- β -N-acetilglucosaminidasa ha sido localizada en partículas citoplásmicas del micelio de Botrytis cinerea, al microscopio óptico y al electrónico.

BIBLIOGRAFIA

- Albersheim, P., Jones, T.M. y English, P.D., (1969).
"Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes". Ann. Rev. Phytopathol. 7, 171-194.
- Albertsson, P.A. (1967). "Two-Phase separation of viruses".
Methods in virology, 2 , 301-321.
- Arima, K., Uozumi, T., y Takahashi, M. (1965). "Studies on
the autolysis of Aspergillus oryzae . Part. I Conditions of
autolysis". Agr. Biol. Chem. 29, 1033-1041.
- Bainbridge, B.W., Bull, A.T., Pirt, S.J., Rowley, B.I. y
Trinci, A.P.J. (1971). "Biochemical and structural changes
in non-growing maintained and autolysing cultures of Asper-
gillus nidulans". Trans. Br. mycol. Soc. 56, 371-385.
- Bartnicki-Garcia, S. (1968). "Cell wall chemistry morpho-
genesis and taxonomy of fungi". Ann. Rev. Microbiol. 22,
87-108.
- Bateman, B.F. y Millar, R.L. (1966). "Pectic enzymes in
tissue degradation". Ann. Rev. Phytopathol. 4, 119-146.
- Basham, H.G. y Bateman, D.F. (1975). "Killing of plants -
cells by pectic enzymes: The lack of direct injurious inte-
raction between pectic enzymes or their soluble reaction -
products and plants cells". Phitopathology, 65, 141-153.
- Bateman, D.F. y Basham, H.G. (1976). "Degradation of plants
cells walls and membranes by microbial enzymes". Enciclope-
dia of plants phisiology, vol.4, Physiological plant patho-
logy. Ed. By R. Heitefuss y P.H. Williams. PP. 316-355. Sprin-
ger-Verlag, Berlin.

- Bauer, W.D., Talmadge, K.W., Keegstra, K., Albersheim, P. (1973). "The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells". Plant. Physiol. 51, 174-187.
- Behr, G. (1930). "Über autolyse bei Aspergillus niger". Arch. Mikrobiol. 1, 418-444.
- Bortels, H. (1927). "Über die bedeutung von Eisen, zink, und, koffer für mikroorganismen. (Unter besonderen Berücksichtigung von Aspergillus niger)". Biochem. Z. 182, 301-358.
- Boyle, C. (1924) "Studies the physiology of parasitism. X. The frooth reactions of certain fungi to their staling products". Ann. Bot. 38, 113-136.
- Block, R.J., Durrum, E.L., Zweiz, G. (1958). "A mamal of paper chromatography and paper electrophoresis". 2nd Ed. New York. Academic Press. Inc.
- Brightwell, R., y Tappel, A. (1968). "lysosomal acid pyrophosphatase and acid phosphatase". Arch. Biochem. Biophys. 124, 333-334.
- Brown, W. (1915). "studies in the Physiology of Parasitism. I. The action of Botrytis cinerea". Ann. Bot. 29, 313-348.
- Camici, L., Sermonti, G. y Chain, E.B. (1952). "Observations on Penicillium chrysogenum in submerged culture. 1. Mycelial growth and autolysis". Bull. World. Health Org. 6, 265-276.
- Chang, S. C. (1940). Soil Science 49, 197-210.

- Clark, W. M., y Lubs, H.A. (1917). "The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its applications in bacteriology". J.Bac. 2, 1.
- Cole, J.S. (1956). "Studies in the Physiology of Parasitism. XX. The pathogenicity of Botrytis cinerea, Sclerotinia fructigena and Sclerotinia laxa, with special reference to the part played by pectolytic enzymes". Ann.Bot. 20, 15-38.
- Crewther, W.G. y Lennox, F.G. (1953). Australian J.Biol. Sci. 6, 410-427.
- Daniel, C., Pease (1964). "Histological techniques for electron microscopy". Academic Press, 52.
- Deverall, B.J. y Wood, R.K.S.(1961). "Infection of beans plants (*Vicia faba* L.) with Botrytis cinerea and B.faba". Ann. Appl. Biol. 49, 461-472.
- Deverall, B.J. y Wood, R.K.S. (1961). "Chocolate spot of beans (*Vicia faba* L.)- interactions between phenolase of host and pectic enzymes of the pathogen". Ann. Appl. Biol. 49, 473-487.
- Domsch y Gams, W. (1972). "Fungi agricultural Soils". Printed in Gred Britain, Constable Ltd, Edinburg.
- Dox, A. W. y Maynard, L. (1912). "Autolysis of mould cultures". J. Biol. Chem. 12, 227-231.
- Dox, A. W. (1913) "Autolysis of mould cultures". J. Biol. Chem. 16, 479-484.

- Emiliani, E. y Retamar, J.A. (1957). "Estudio sobre la inducción de la autólisis en una cepa de Aspergillus niger". Rev. Fac. Ing. Anim. Santa Fé. Arg. 26, 15-35.
- Emiliani, E. y Parera, J.M. (1958). "Estudio sobre la inducción de la autólisis en una cepa de Aspergillus niger. II. Examen preliminar de varios grupos de sustancias nitrogenadas e identificación de los aminoácidos del autolizado". Rev.Fac. Ing. Anim. Santa Fé. Arg. 27, 99-112.
- Emiliani, E. y Tessi, M.A. (1971). "Nucleótidos y nucleótidos-azúcares en una cepa de Aspergillus niger buena productora de ácido cítrico". Rev. Fac. Ing. Anim. Santa Fé. Arg. 40, 57-67.
- Emiliani, E. y Vcha de Davie, I. (1959). "Estudio sobre la inducción de la autólisis en una cepa de Aspergillus niger.III. Polialcoholes". Rev. Fac. Ing. Anim. Santa Fé. Arg. 28, 105-117.
- Emiliani, E. y Vcha de Davie, I. (1962). "Induced autolysis of Aspergillus phoenicis (A. niger, group). IV. Carbohydrates". Appl. Microbiol. 10, 504-512.
- Fencel, Z. (1978). "Cell ageing and autolysis". The Filamentous fungi. V.3. Developmental mycology. Edited by Smith, J.E. y Berry, D.R. Publishors by Edward Arnold.
- Fergus, B.J., Frocter, A.R., Scott, J.A.N. y Goring, D.A. I., (1969). "The distribution of lignin in sprucewood as determined by ultraviolet-microscopy". Wood Sci. and Technol. 3, 117-138.

- Forsberg, C., y Rogers, H.J. (1971). "Autolytic enzymes in growth of bacteria". Nature, London, 229 , 273.
- Fushtey, S.G. (1957). "Studies in the Physiology of Parasitism. XXIV. Further experiments on the killing of plants cells by fungal and bacterial extracts". Ann. Bot. 21, 273-286.
- Gola, G., Negri, G., Coppelletti (1965). "Tratado de Botánica". Ed. Labor. S.A.
- Gomez, P., Reyes, F. y Lahoz, R. (1977). "Effect of the level of the carbon source on the activity of some lytic enzymes released during autolysis of Aspergillus niger". Mycopathologia, 62, 23-30.
- Hancock, J.G., Millar, R.L. y Lorbeer, J.W. (1964). "Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by Botrytis allii, B.cinerea, y B.squamosa in vitro and in vivo". - Phytopathology, 54, 928-931.
- Hayashi, M. (1965). "Histochemical demonstration of N-acetyl- β -glucosaminidase employing naphthol ASBI-N-acetyl- β -glucosaminide as substrate". J. Histochem.Cytochem. 13, - 355-360.
- Hislop, E.C., Keon, J.P.R. y Fielding, A.H.(1979), "Effects of pectin-lyases from Monilinia fructigena on viability, ultrastructure and localization of acid phosphatase of cultured apple cells". Physiological Plant Pathology. 14, 371-381.

- Hockenhull, D.J.D. (1946). "Studies in penicillium production by P.notatum: I. A preliminar study of the metabolism of carbon, nitrogen, sulphur and phosphorous". Biochem. J. (London), 40, 337-343.
- Hockenhull, D.J.D. (1950). "Studies in the metabolism of mould fungi. I. A preliminar study of the metabolism of - carbon, nitrogen and sulphur by Aspergillus nidulans". J. Exp. Botany, 1, 194-200.
- Horikoshi, K. y Sakaguchi, K.H. (1958). "Studies on autolysis of Aspergillus oryzae. The lytic phenomenon of Aspergillus oryzae caused by Bacillus circulans". J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 1-11.
- Hughes, R.C. (1971). "Autolysis of Bacillus cereus cell - wall and isolation of structural components". Biochem. J. 121, 791-802.
- Ishii, S. y Kiho, K. (1976). "evidence for a factor that stimulated tissue maceration by pectolytic enzymes". Phytopathology, 66, 1077-1081.
- Jeanes, A. (1951). Ann. Chem. 23, 415.
- Jeuniaux, (1966). "Chitinases". Methods in enzymology. 8, 644-650.
- John, H. y Luft, M.D. (1961). "Improvements in epoxy resin embedding methods". J.Biophy. Biochem. Cytology, 9 , 409-414.

- Kabat y Mayer's. (1961). "Dische colorimetric carbazole methods". 2ª edición.
- Keen, N.T. y Horton, J.C. (1966). "The polygalacturonase of Pyrenochacta terrestris". Phytopathology, 56, 603-609.
- Lahoz, R. (1967). "Quantitive changes in the content of non-nitrogenous compounds during autolysis of Aspergillus terreus". J. Gen. Microbiol, 46, 451-456.
- Lahoz, R., Ballesteros, A. M., y Gonzalez Ibeas, J. (1971). "Chemical and physiological changes in filamentous fungi - during autolysis. X. Changes in the concentration of polyols in autolysing cultures of several fungi". Mycopathologic et Mycologic applicate, 43, 223-228.
- Lahoz, R., Ballesteros, A. M. y Jimenez, L. (1974). "Influence of temperature on the autolytic phase of growth of Aspergillus niger". Ann. Bot. 38, 661-666.
- Lahoz, R., y Gonzalez Ibeas, J. (1968). "The autolysis of Aspergillus flavus in on alkaline medium". J. Gen. Microbiol. 53, 101-108.
- Lahoz, R., y Miralles, M. (1970). "Influence of the level of the carbon source on the autolysis of Aspergillus niger". J. Gen. Microbiol. 62, 271-276.
- Lahoz, R., Reyes, F. y Beltrá, R. (1966). "Some chemical changes in the mycelium of Aspergillus flavus during autolysis". J. Gen. Microbiol. 45, 41-49.
- Lahoz, R., Reyes, F., Beltrá, R. y Garcia Tapia C. (1967).

"The autolysis of Aspergillus terreus in a physiologically acid medium". J.Gen. Microbiol. 49, 259-265.

- Lahoz, R., Reyes, F. y Ballesteros, A.M. (1969). "Chemical and physiological changes in fungi during autolysis. V. Further observations on the autolysis of Aspergillus flavus". Mycopathol. Mycol. Appl. 38, 367-372.
- Lahoz, R., Reyes, F., y Gomez, P. (1978). "Influence in the carbon/nitrogen relationship on the degree of autolysis of Aspergillus niger". Can. J. Bot. 56, 1806-1808.
- Lahoz, R., Reyes, F., y Martinez, B. (1969). "Cambios químicos y fisiológicos en hongos filamentosos durante la autólisis. VI. Variación de la cantidad de amoníaco desprendido durante la autólisis inducida del Aspergillus flavus". Mycopathol. Mycol. Appl. 38, 199-207.
- Lahoz, R., Reyes, F., y Martinez, M.J. (1979). "Effect on the pH on the degree of autolysis of Aspergillus niger". Can. J. Bot. 57, 1901-1903.
- Lahoz, R., Reyes, F., y Perez-Leblic, M.I. (1976). "Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi". Mycopathology, 60, 45-49.
- Leal, J.A., Blanco, E. y Gomez Miranda, B. (1979) "Ultrastructure of resting and germinated sclerotic of Botrytis cinerea". Trans. Br. mycol. Soc. 72, 463-468.
- Leal, J.A., Lilly, V.G. y Gallegly, M.E. (1968). "The production of indolacetic acid from L-triptophan by species of Phytophthora". Can. J. Microbiol. 14, 595-600.

- Leal, J.A., Ruperez, P., y Gomez Miranda, B. (1979). "Extracellular glucan production by Botrytis cinerea". Trans. Br. mycol. Soc., 72, 172-176.
- Lowry, O.H. ; Rosebrong, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.S. (1951). "protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem., 193, 265.
- Mahadevan, P.R. y Mahodkar, U.R. (1970). "Role of enzymes in growth and morphology of Neurospora crassa". J. of Bacteriol., 101, 941-947.
- Mandels, R.G. (1965). "The Fungi". I. Edited por Ainsworth G.C. y Sussman, A.S. Academic Press., N.Y. 559.
- Manocha, M.S. y Colvin, J.R. (1967) "Structure and composition of the cell wall of Neurospora crassa". J. Bacteriol. 94, 102-112.
- Matile, P.H. (1969). "Lisomas in Biology and pathology". 14 A, editado por Dingle, J. T. Honor, B. F. de North Hollar Research monograph frontieres of Biology, cap. XIV.
- Mc.Clendon, J.H. (1964). "Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell walls based on chromatography of macerating enzymes". Ann. J. Bot. 11, - 628-633.
- Mc. Lelland, W., Mc.Daniel, L.E. y Lampen, J.O. (1971). "Purification of phosphomannase, and its action on the yeast cell wall". J.Bacteriol., 102, 261-270.

- Metz, O. (1930). "Über wachstum und farbstoffbildung einiger pilze unter dem Einflub von Eiseu, Zink und kupfer". Arch. Mikrobiol., 1, 197-251.
- Metzenberg, R.L. (1962). "The localization ob b-fructofuranosidase in Neurospora". Arch. Biochem. Biophys., 96, 468-474.
- Michel-Durand, E. (1938). Bull.Soc. Chim. Biol., 20, 399-412.
- Mitchell, R., y Sabar, N. (1966). "Autolytic enzymes in fungal cell walls". J. Gen. Microbiol., 42, 39-42.
- MÜhlethaler, K. (1967). "Ultraestructure and formation of plant cell walls". Ann. Rev.Plant. Physiol., 18, 1-24.
- Nagel, C.W. y Anderson, M.M. (1965). "Action of a bacterial transeliminase on normal and insaturated oligalacturonic acid". Arch. Biochem. and Biophys., 112, 322-330.
- Nelson, N. (1944). "Aphotometric adaptation of the Somoogyi method for the determination of glucose". J. Biol. Chem., 153, 375-380.
- Neukom, H. (1960). "Über farbreaktionen von urosäuren mit thiobarbitursäure". Chimia, 14, 165-167.
- Northcote, D.H. (1963). "The biology and chemistry of the cell walls of higher plants, algae, and fungi". Int. Rev. Cytol., 14, 223-265.

- Olutiola, P.O. y Akintunde, O.A. (1979). "Pectin lyase - and pectin methylesterase production by Penicillium citrinum". Trans. Br. Mycol. Soc., 72, 49-55.
- Pitt, D. (1968). "Histochemical demonstration of certain hydrolytic enzymes within cytoplasmic particles of Botrytis cinerea Fr.". J. Gen. Microbiol., 52, 67-75.
- Polacheck, Y. y Rosemberger, R.F. (1975). "Autolytic enzymes in hyphae of Aspergillus nidulans: their action on old and newly formed walls". J. of Bacteriol., 121, 332-337.
- Porter, F.M. (1966). "Protease activity in diseased fruits". Phytopathology, 56, 1424-1425.
- Pratt, C.A. (1924). "The staling of fungal cultures . I. General and Chemical investigation of staling by Fusarium". Ann. Bot. 38, 563-595.
- Pratt, C.A. (1924). "The staling of fungal cultures. II. The alkaline metabolic products and their effect on the - growth of fungal spores". Ann. Bot., 38, 599-615.
- Raistrick, H. y Vincent, J. M. (1968). "Studies in the biochemistry of micro-organisms. A survey of the fungal metabolism of inorganic sulphates". Biochem. J. (London), 43, 90-99.
- Reyes, F. y Byrde, R.J.W. (1973). "Partial purification and properties of a β -N-acetylglucosaminidase from the - fungus Sclerotinia fructigena". Biochem. J., 131, 381-388.

- Reyes, F. y Lahoz, R. (1977). "Variation in lysis of - walls of Sclerotinia fructigena with age of culture". J. Gen. Microbiol., 98, 607-610.
- Reyes, F., Lahoz, R. y Cornago, P. (1977). "Autolysis of Neurospora crassa in different culture conditions and re lease of B-N-acetilglucosaminidase and chitinase". Trans. Br. Mycol. Soc., 68, 357-361.
- Reyes, F., Lahoz, R. y Val Moreno, A. (1979). "Influence of carbon and nitrogen sources on release of B-(1,3)-glu canase and B-N-acetilglucosaminidase during Neurospora - crassa autolysis". Trans. Br. Mycol. Soc., 72, 447-451.
- Rexova-Benkova, L. y Markovic, O. (1976). Pectic enzy- mes in Advances in carbohydrate chemistry and Biochemistry Vol. 33, 323-385. Eds. R. Stuart Tipson y D. Horton-Acade- mic Press. New York-San Francisco-London.
- Reynolds, E.S. (1963). "The use of lead citrate at night pH as electron-opaque stain in electron microscopy". J. - Cell. Biol., 17, 208.
- Rippel, A. y Behr, G. (1930). "Über die verteilung des - magnesiums in Pilzmycel". Arch. Mikrobiol., 1, 271-276.
- Rippel, A. y Behr, G. (1936). Arch. Mikrobiol., 7, 584- 589.
- Ritter, R. (1955). "Physiologische Untersuchungen an Zygo myceten". Arch. für Mikrobiol., 22, 248-284.

- Semeniuk, G. (1944). Iowa. State. Coll. J. Sci., 18, -
325-358.
- Sherwood, R.T. (1966). "Pectin lyase y poligalacturonase -
production by Rhizoctonia solani and other fungi". Phyto-
pathology, 56, 279-285.
- Shibata y Nisizawa, K. (1965). Arch. Biochem. Biophys., 109
516.
- Smithies, W.R. (1953). "The lysing action of enzymes on a
sample of mycelium of Penicillium griseofulvum Dierckx".
Biochem. J., 55, 346-350.
- Somogyi, M. (1945). "A new reagent for the determination
of sugars". J. Biol. Chem., 160, 61-73.
- Summer, J. B. y Howell, S.F. (1935). J. Biol. Chem., 108,
51.
- Talmadge, K.W., Keegstra, K, Bauer, W.D. y Albersheim, P.
(1973). "The structure of plant cell walls. I. The macro-
molecular components of the walls of suspension cultured
sycamore cells with a detailed analysis of the pectic po-
lysaccharides". Plant. Physiol., 51, 158-173.
- Tandon, R.N. y Chandra, S. (1962). "Changes in aminoacids,
sugars and organic acids in the mycelium of Colletotrichum
glucosporioides during the autolytic phase of growth".
Phyton, 19, 127-132.

- Teorell, T. y Stenhagen, E. (1938). "Ein universal buffer für den pH bereich 2,0 bis 12,0". Biochem. Z., 299, 416-419.
- Thaysen, A.C. y Bunker, M.J. (1927). "The microbiology of cellulose, hemicellulose, pectin and gums". Cap. V. 77-94. Oxford University Press. London: Humphrey Milford.
- Tracey, M.V. (1943). "Chitin". Modern methods of Plant Analysis, 2, 264-274.
- Trager, W. (1932) y Ziesel (1931). Biochem. J. 26, 1762.
- Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S. (1952). "Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates". Biochem. J., 50, 298-303.
- Tribe, H.T. (1955). "Studies in the Physiology of Parasitism. XIX. On the killing of plant cells by enzymes from Botrytis cinerea and Bacterium aroideae". Ann. Bot., 19, 351-368.
- Trinci, P.J. y Righelato, R.C. (1970). "Changes in constituents and ultrastructure of hyphal compartments during autolysis of glucose-starved Penicillium chrysogenum". J. Gen. Microbiol., 60, 239-249.
- Tseg, T.C. y Bateman, D.F. (1968). "Production of phosphatidases by phytopathogens". Phytopathology, 58, 1437-1438.

- Urbaneck, H. y Zalewska-Sobczak, J. (1975). "Polygalacturonase of Botrytis cinerea E-200 Pers". Biochem. Biophys. Acta 377, 402-409.
- Uozumi, T., Takahashi, M. y Arima, K. (1965). "Studies on the autolysis of Aspergillus oryzae. Part II.- Morphological change of mycelia and degradation products of cellular constituents". Agr. Biol. Chem. 29, 1050-1065.
- Uozumi, T., Tamura, G. and Arima, K. (1968). "Studies on the autolysis of Aspergillus oryzae. Part. III. Activation of intracellular ribonuclease". Agr. Biol. Chem., 32, 963-968.
- Uozumi, T., Tamura, G. y Arima, K. (1968). "Studies on the autolysis of Aspergillus oryzae. Part. IV. Presence of a ribonuclease inhibition in the mycelia". Agr. Biol. Chem. 32, 969-964.
- Uozumi, T., Tamura, G. y Arima, K. (1969). "Studies on the autolysis of Aspergillus oryzae. Part. V. Purification of an intracellular new nuclease". Agr. Biol. Chem. 33, 25-30.
- Van den Berg, L. y Yang, S.M. (1969). "Effect of relative humidity on production of extracellular pectolytic enzymes by Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum". Can. J. of Botany, 47, 1007-1010.
- Vessey, J.C. y Pegg, G.F. (1973). "Autolysis and chitinase production in cultures of Verticillium albo-atrum". Trans. Br. Mycol. Soc., 60, 133-143.

- Webster, J. (1970). "Introduction to Fungi". Published by the Syndies of the Cambridge University Press.
- Wessels, J.G.H. y Koltin, Y. (1972). "R-glucanase activity and susceptibility of hyphal walls to degradation in mutants of Schizophyllum with disrupted nuclear migration". J. Gen. Microbiol., 71, 471-475.
- Wilson, A.R. (1935). "Relation of Botrytis spp. to the chocolate spot disease of beans (*Vicia faba*)". Nature, London, 136, 226.
- Wilson, A.R. (1937). "The chocolate spot disease of beans, (*Vicia faba* L.) caused by Botrytis cinerea Pers". Ann. Appl. Biol., 24, 258-288.
- Willets, H.J. y Byrde, R.J.W. y Fielding, A.H. (1977). "The taxonomy of the brown rot fungi (Monilinia, spp) related to their extracellular cell wall-degrading enzymes". J. of Gen. Microbiol., 103, 77-83.
- Wollen, J.W., Heywoth, R. y Walker, P. G. (1961). "Studies on glucosaminidase, 3 testicular N-acetil-B-glucosaminidase and N-acetil-B-galactosaminidase". Biochem. J., 78, 111-116.
- Wood, R.K.S. (1967). Physiological Plant Pathology. Oxford: Blackwell Scientific Publ. Ltd.
- Wood, R.K.S. (1973). ' Specificity in plant disease in: Fungal pathogenicity and plant's response 1-16, (R.J.W. Byrde, C.V. cutting, eds.) London: Academic Press.

- Woolley, D.W. y Peterson, W.H. (1937). J.Biol. Chem., 114 85-90.
- Woolley, D.W. y Peterson, W.H. (1937). "The chemistry of mold tissue. XII. Isolation of arginine, histidine and - lysine from Aspergillus sydowi". J. Biol. Chem., 118, 363 370.
- Woolley, D.W. y Peterson, W.H. (1937). "The chemistry of mold tissue .XIII. Isolation of some monoaminomonocarboxy and some monoaminodicarboxy acids from Aspergillus sydowi". J. Biol. Chem., 121, 507-520.

